

---

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg**

vorgelegt von  
Diplom – Chemiker Marc Fröschke  
aus Hilden  
2001

Tag der mündlichen Prüfung:

---

**Charakterisierung der Abspaltung**  
**und des Schicksals der Signalsequenz**  
**des Glykoproteins des**  
**lymphozytären Choriomeningitis Virus**

Gutachter:

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

Prof. Dr. Eduard Hurt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Intrazelluläre Protein-Lokalisierung</b>	<b>1</b>
1.1.1	Organellen endosymbiontischen Ursprungs	3
1.1.2	Endomembran-System	4
<b>1.2</b>	<b>Signalsequenzen vermitteln den zielgerichteten Transport</b>	<b>7</b>
1.2.1	Proteinimport	9
1.2.1.1	Peroxisomen	10
1.2.1.2	Mitochondrien	10
1.2.1.3	Chloroplasten	12
1.2.2	Proteinexport	13
1.2.2.1	Die Plasmamembran von <i>E. coli</i>	13
1.2.2.2	Der Sekretorische Weg in Eukaryonten	15
<b>1.3</b>	<b>ER-spezifische Signalsequenzen</b>	<b>15</b>
1.3.1	Struktur der Signalsequenzen	16
1.3.2	Kotranslationale Translokation	16
1.3.3	Posttranslationale Translokation	18
<b>1.4</b>	<b>N-terminale Signalsequenzen und deren Abspaltung</b>	<b>19</b>
1.4.1	Signalsequenz-Abspaltung	19
1.4.2	Nicht-abgespaltete Signalsequenzen (Signal-Anker-Sequenz)	20
1.4.3	Besondere Eigenschaften von Signalsequenzen	21
1.4.3.1	Effizienz des zielgerichteten Transports	21
1.4.3.2	Kotranslationale Signalsequenz-Abspaltung	21
1.4.3.3	Posttranslationale Signalsequenz-Abspaltung	22
<b>1.5</b>	<b>Schicksal von Signalpeptidfragmenten</b>	<b>22</b>
1.5.1	Signalpeptid-Prozessierung in <i>E. coli</i>	23
1.5.2	Signalpeptid-Prozessierung in Eukaryonten	23
1.5.3	Funktionen von Signalpeptidfragmenten	23
1.5.4	Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch MHC I-Moleküle	24
1.5.4.1	Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch klassische MHC I-Moleküle	25
1.5.4.2	Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch nicht-klassische MHC I-Moleküle	25
<b>1.6</b>	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>26</b>
1.6.1	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus (LCMV)	26
1.6.1.1	Intrazellulärer Transport des LCMV-Glykoproteins	26
1.6.1.2	Signalsequenz des pGP-C	27
1.6.1.3	CTL-Epitop innerhalb der Signalsequenz	28
1.6.2	Experimenteller Ansatz	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
2.1.1	Zellkultur	29
2.1.1.1	Zelllinien	29
2.1.1.2	Material für die Zellkultur	29
2.1.2	Bakterien	29
2.1.3	Reagenzien	29
2.1.3.1	Chemikalien	29
2.1.3.2	Radiochemikalien	30

# Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Standardlösungen und Puffer	31
2.1.5	Enzyme	31
2.1.6	Proteinstandards	31
2.1.7	Nukleinsäuren und Plasmide	31
2.1.7.1	DNS-Standards	31
2.1.7.2	Oligonukleotide	32
2.1.7.3	Plasmide	33
2.1.8	Antikörper	33
2.1.9	Peptide	34
2.1.10	Rechner-Programme	34
2.1.11	Geräte	34
2.1.12	Sonstiges	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
2.2.1	Herstellung der verwendeten Konstrukte	35
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.2	TOPO-Klonierung	36
2.2.1.3	Herstellung von transformationskompetenten Bakterien und deren Transformation	36
2.2.1.4	Änderung der Basentriplets	37
2.2.1.5	Gezielte Mutagenese von Plasmiden	38
2.2.2	SDS-PAGE	39
2.2.3	Western Blot	40
2.2.4	<i>In vitro</i> Translations-/Translokationssystem	42
2.2.4.1	Herstellung des Weizenkeim-Extraktes	42
2.2.4.2	Herstellung von Rauhen Mikrosomen (RM)	43
2.2.4.3	Isolierung des Signalerkennungspartikels (SRP)	45
2.2.4.4	<i>In vitro</i> Transkription	46
2.2.4.5	Translations-/Translokationsreaktion	47
2.2.5	Herstellung von Antikörpern	48
2.2.5.1	Peptid-Kopplung an KLH	49
2.2.5.1.1	Peptid-Kopplung an KLH mit Glutaraldehyd	49
2.2.5.1.2	Peptid-Kopplung an KLH mit Sulfo-SMCC	49
2.2.5.2	Dialyse der Kopplungsreaktionslösung	50
2.2.5.3	Herstellung der Emulsion mit Freund's Adjuvant	50
2.2.5.4	Immunisierung von Kaninchen	50
2.2.6	Antikörper-Isolierung durch Affinitätschromatographie	51
2.2.6.1	Blutaufbereitung	51
2.2.6.2	Ammoniumsulfat-Fällung der Antikörper und Dialyse	51
2.2.6.3	Affinitätschromatographische Isolierung der Antikörper	52
2.2.6.3.1	Kopplung des Peptids an eine NHS-aktivierte Sepharose-Matrix	52
2.2.6.3.2	Affinitätschromatographie	53
2.2.7	Immunopräzipitation unter nativen oder denaturierenden Bedingungen	53
2.2.8	Transfektion von kultivierten Zellen	55
2.2.8.1	Kultivierung von Eukaryontenzellen	55
2.2.8.2	Einfrieren von eukaryontischen Zellen	56
2.2.8.3	Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Plasmid-DNS	57
2.2.8.3.1	Elektroporation	57
2.2.8.3.2	Kalziumphosphat-Methode	57
2.2.9	Analyse der transfizierten Zellen	58
2.2.9.1	<i>In situ</i> $\beta$ -Galaktosidase-Untersuchung bei kultivierten Zellen	58
2.2.9.2	Radioaktive metabolische Markierung von eukaryontischen Zellen	59

# Inhaltsverzeichnis

2.2.9.3	Isolierung und Aufschluß von eukaryontischen Zellen	60
2.2.9.4	Zellfraktionierung von eukaryontischen Zellen	60
2.2.9.5	Infektion von MC57-Zellen mit dem LCM-Virus	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C <i>in vitro</i></b>	<b>64</b>
3.1.1	Überblick über das verwendete <i>in vitro</i> System	64
3.1.2	Überblick über die im <i>in vitro</i> System verwendeten Konstrukte	65
3.1.3	Translation und Translokation von pPL <sub>86</sub> und GP-C <sub>142</sub>	66
3.1.4	Charakterisierung von anti-Peptid-Antikörpern	68
3.1.5	Identifizierung und Charakterisierung der von pGP-C <sub>142</sub> abgespalteten Signalsequenz	70
3.1.6	Translokation und Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C von einem Fusionsprotein	72
3.1.7	Charakterisierung der Translokation des pGP-C <sub>142</sub> -HA	74
<b>3.2</b>	<b>Intrazellulärer Transport und proteolytische Prozessierung des Glykoproteins</b>	<b>76</b>
3.2.1	Überblick über die <i>in vivo</i> verwendeten Konstrukte	76
3.2.2	Expression verschiedener Konstrukte des pGP-C	77
3.2.3	Stabilität und N-Glykosylierung des pGP-C-HA	79
3.2.4	Sensitivität des g-pGP-C-HA gegenüber Endo H und PNGase F	80
3.2.5	Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C-HA	82
3.2.6	Identifizierung der abgespalteten Signalsequenz des pGP-C-HA	83
3.2.7	Die Abspaltung der Signalsequenz vom pGP-C	85
3.2.8	Membran-Assoziation der abgespalteten Signalsequenz	87
3.2.9	Die Abspaltung der Signalsequenz von einer verkürzten Form des pGP-C	88
3.2.10	Protease-Sensitivität des pGP-C-HA und der abgespalteten Signalsequenz	89
3.2.11	Stabilität der abgespalteten Signalsequenz nach Infektion mit LCMV	91
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Abspaltung der Signalsequenz von pGP-C</b>	<b>93</b>
4.1.1	Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C <i>in vitro</i>	93
4.1.2	Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C <i>in vivo</i>	96
4.1.2.1	Expression verschiedener Formen des pGP-C in HeLa-Zellen	96
4.1.2.2	Membran-Assoziation und intrazellulärer Transport	97
4.1.2.3	Abspaltung der Signalsequenz von pGP-C-HA und pGP-C <sub>362</sub> -HA	98
4.1.3	Merkmale der abgespalteten Signalsequenz	99
4.1.3.1	Stabilität der abgespalteten Signalsequenz unter physiologischen Bedingungen	99
4.1.3.2	Stabilität der abgespalteten Signalsequenz gegenüber Protease-Verdau	100
4.1.3.3	Mögliche Topologien der abgespalteten Signalsequenz innerhalb der ER-Membran	101
<b>4.2</b>	<b>Mögliche Bedeutung der Signalsequenz des pGP-C für LCMV</b>	<b>104</b>
4.2.1	Regulation der Signalsequenz-Abspaltung von pGP-C	104
4.2.2	Stabilität der SS <sup>GPC</sup> und Präsentation des CTL-Epitops auf der Zelloberfläche	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>123</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau einer typischen tierischen Zelle	2
Abb. 2	Komponenten des Endozytose-Weges und des Sekretorischen Weges	6
Abb. 3	Prozessierung des Glykoproteins und Verankerung von GP-1 und GP-2 in der Plasmamembran	27
Abb. 4	Aufbau einer Western Blot-Apparatur	40
Abb. 5	Schematische Darstellung der Puromycin-induzierten Abspaltung der Signalsequenz	64
Abb. 6	Schematische Darstellung der im in vitro System verwendeten Konstrukte	66
Abb. 7	In vitro Translation/Translokation von pPL <sub>86</sub> und GP-C <sub>142</sub>	67
Abb. 8	Charakterisierung von anti-Peptid-Antikörpern	69
Abb. 9	Identifizierung und Charakterisierung der von pGP-C <sub>142</sub> abgespalteten Signalsequenz	71
Abb. 10	Translokation und Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C von einem Fusionsprotein	73
Abb. 11	Charakterisierung der Translokation des pGP-C <sub>142</sub> -HA	75
Abb. 12	Expression verschiedener Konstrukte des pGP-C	78
Abb. 13	Stabilität und N-Glykosylierung des pGP-C-HA	80
Abb. 14	Sensitivität des g-pGP-C-HA gegenüber Endo H und PNGase F	81
Abb. 15	Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C-HA	82
Abb. 16	Identifizierung der abgespalteten Signalsequenz des pGP-C-HA	84
Abb. 17	Die Abspaltung der Signalsequenz vom pGP-C	86
Abb. 18	Membran-Assoziation der abgespalteten Signalsequenz	88
Abb. 19	Die Abspaltung der Signalsequenz von einer verkürzten Form des pGP-C (GP-C <sub>362</sub> -HA)	89
Abb. 20	Protease-Sensitivität des pGP-C-HA und der abgespalteten Signalsequenz	90
Abb. 21	Die abgespaltete Signalsequenz des pGP-C und das pGP-C nach LCMV-Infektion	91
Abb. 22	Abspaltung der Signalsequenz des pPL <sub>86</sub> und pGP-C <sub>142</sub> in vitro	94
Abb. 23	Mutationen innerhalb des pGP-C gegenüber dem Wildtyp-Glykoprotein	97
Abb. 24	Mögliche Topologien der abgespalteten Signalsequenz innerhalb der ER-Membran	102
Abb. 25	Vorhergesagte Membran-Topologien von pGP-C und abgespalteter Signalsequenz	103
Abb. 26	Die Proteine pGP-C, GP-C und SS <sup>GPC</sup> im ER	105
Abb. 27	Schematische Darstellung der Prozessierungen und des intrazellulären Transportes	108

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Intrazelluläre Protein-Lokalisierung

Zellen enthalten eine sehr große Anzahl von hauptsächlich zytosolischen Proteinen, die sich in ihren Strukturen und Funktionen stark unterscheiden. Die Funktion eines Proteins hängt kritisch von seiner richtigen Lokalisierung ab. Daher werden Proteine zielgerichtet mit einer hohen Spezifität und Effizienz zu einer Anzahl von Lokalisierungen inner- und außerhalb der Zelle transportiert (Pugsley, 1989). Zusätzlich haben Zellen aufwendige Systeme entwickelt, um Membran-begrenzte Kompartimente, die spezifische Proteine enthalten, aufzubauen. Etwa ein Drittel der Proteine einer Zelle sind Membranproteine. Aber auch viele lösliche Proteine müssen eine oder mehrere Membranen überqueren, um ihre endgültige Lokalisierung zu erreichen (entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb eines intrazellulären Kompartimentes) (Attardi und Schatz, 1988; Blobel, 1980; Verner und Schatz, 1988). Damit sind etwa 50% der zellulären Proteine in einer Membran verankert oder müssen eine Membran überqueren.

Die frühesten Membranproteine stammen wahrscheinlich von zytoplasmatischen Proteinen, die Eigenschaften erworben haben, mit denen sie spontan in Zellmembranen inserieren konnten. Die meisten Membranproteine müssen jedoch zielgerichtet zu den Membranen transportiert und aktiv in die Membranen inseriert werden.

Der zielgerichtete Transport von Proteinen ist prinzipiell eine Eigenschaft von Signalen innerhalb der Proteinstruktur von zytoplasmatischen und Membran-Proteinen. Bestimmte Proteine können diese Signale erkennen und damit den spezifischen, zielgerichteten Proteintransport und die Translokierung in bzw. über die Membran erleichtern.

Die vielfältigen Aufgaben, die eine Zelle zu erfüllen hat, werden durch spezielle Kompartimente ausgeführt. Diese Kompartimente können in drei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe besteht aus Organellen, die wahrscheinlich endosymbiontischen Ursprungs sind. Zu dieser Gruppe gehören die Mitochondrien, die Chloroplasten und wahrscheinlich die Peroxisomen. Die zweite Gruppe bildet ein Netzwerk von Membranen, das „Endomembran-System“ genannt wird. Dazu gehören das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Lysosomen, die Endosomen und die Plasmamembran (PM).

Alle diese Kompartimente sind im Zytosol eingebettet, welches die dritte Gruppe bildet.

Die meisten Proteine der Zelle werden durch das Genom kodiert, das sich im Zellkern befindet. Manche mitochondrialen und chloroplastischen Proteine werden jedoch von Organell-eigenen Genomen kodiert. Die Synthese von Proteinen kann entweder durch zytosolische oder Kompartiment-eigene Ribosomen erfolgen. Der Ort der Synthese eines Proteins stimmt aber häufig nicht mit seinem Bestimmungsort überein. Daher müssen viele Proteine vom Ort ihrer Synthese zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten transportiert werden.

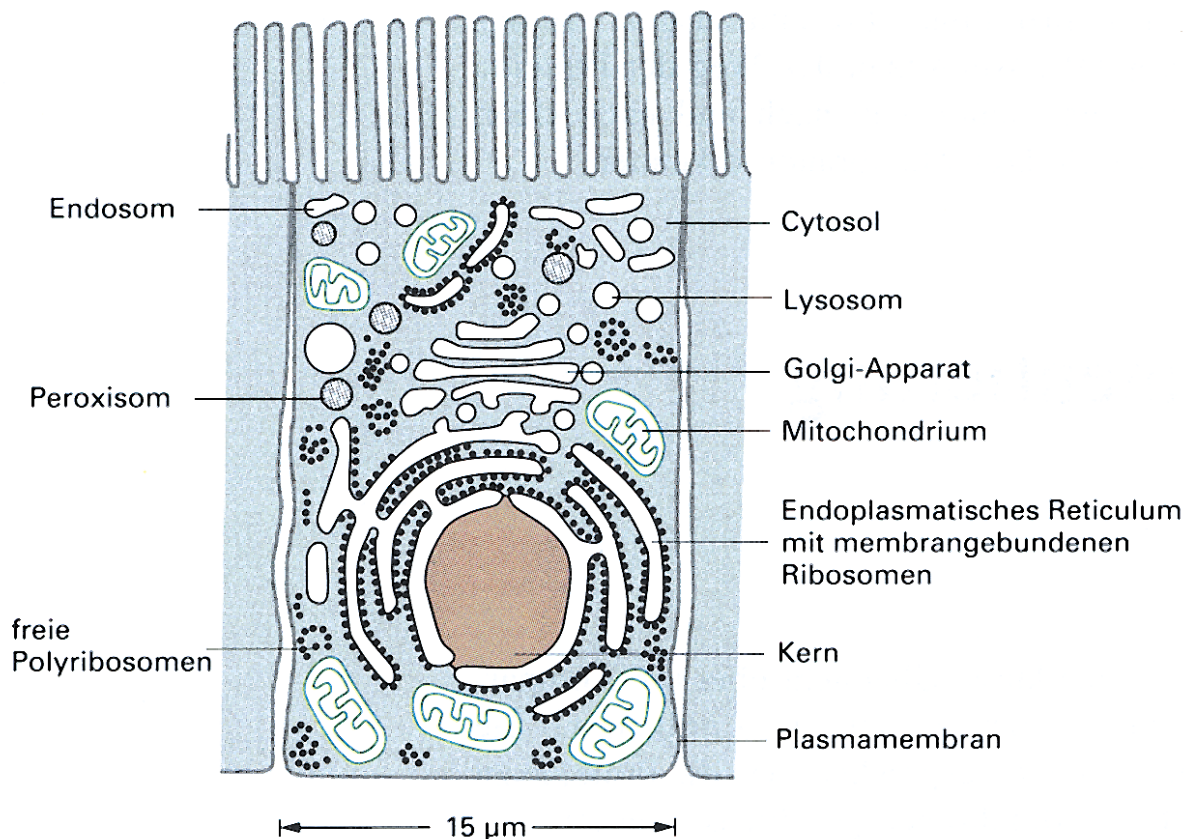
## Einleitung

Für den zielgerichteten Transport von Proteinen gibt es verschiedene Systeme, die in Import- und Exportsysteme eingeteilt werden. Beide Systeme können sehr viele verschiedene Proteine transportieren und haben einen ähnlichen Satz von Prinzipien gemeinsam (Schatz, 1986). Es gibt wahrscheinlich auch Membranen, die spezielle Systeme besitzen und die nur wenige Proteine transportieren. Aber diese Systeme unterscheiden sich sehr von den generellen Systemen.

Exportsysteme befinden sich in der bakteriellen PM, dem ER und den internen Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten. Bei diesen Systemen werden die Proteine in extrazytosolische Kompartimente (bakterielles Periplasma, Lumen des ER, Thylakoid-Lumen, mitochondriale innere Membran) transportiert.

Importsysteme befinden sich in der Peroxisomen-Membran sowie den äußeren und inneren Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten. Sie transportieren Proteine in Kompartimente, die funktionell äquivalent zum Zytosol sind oder davon evolutionär abgeleitet werden können (innere Kompartimente von Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen) (Margulis, 1970).

Damit besitzen Mitochondrien und Chloroplasten sowohl Export- als auch Importsysteme.



**Abb. 1** Aufbau einer typischen tierischen Zelle

Zytosol (grau), ER, Golgi-Apparat, Zellkern, Mitochondrium, Lysosom und Peroxisom stellen getrennte Reaktionsräume dar, die vom Rest der Zelle durch mindestens eine, nur selektiv permeable, Membran abgeteilt sind.

(entnommen aus: Alberts, B. *et al.*, 1995)



# Einleitung

---

## 1.1.1 Organellen endosymbiontischen Ursprungs

Zu dieser Gruppe von Zell-Kompartimenten gehören die Peroxisomen, Mitochondrien und Chloroplasten. Mitochondrien und Chloroplasten stammen wahrscheinlich von prokaryontischen Organismen ab, die als Symbionten im Zytosol von primitiven eukaryontischen Zellen lebten. Alle diese Organellen sind wahrscheinlich selbstreplizierend.

Mitochondrien kommen in nahezu allen Eukaryontenzellen vor. Sie besitzen spezialisierte Proteine und eine Membranstruktur, durch die Energie aus chemischen Brennstoffen (z. B. Pyruvat) genutzt werden kann, um Adenosintriphosphat (ATP) aus den Edukten Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat zu produzieren. Dieses ATP besitzt für die gesamte Zelle eine zentrale Bedeutung als Energielieferant.

Mitochondrien bestehen aus den vier unabhängigen Kompartimenten äußere und innere Membran, dem Intermembranraum und der Matrix. Dabei befindet sich der Intermembranraum zwischen der äußeren und inneren Membran und die innere Membran schließt die Matrix ein. Die überwiegende Mehrheit der in den Mitochondrien lokalisierten Proteine wird durch das Genom im Zellkern kodiert. Diese Proteine müssen also nach ihrer Synthese im Zytosol zielgerichtet transportiert und ins Mitochondrium importiert werden. Wenn der Bestimmungsort eines solchen Proteins die Matrix ist, muß es zwei Membranen überqueren.

Ein Teil der Mitochondrien-Proteine wird aber vom Mitochondrium-Genom kodiert, das sich in der Matrix befindet. Einige dieser in der Matrix synthetisierten Proteine verbleiben dort, während andere über bzw. in die innere Membran exportiert werden.

Chloroplasten gibt es nur in Pflanzenzellen. Eine Reihe von speziellen Proteinen ist in funktionellen Komplexen vereint, die Sonnenlicht absorbieren (Photosystem I und II). Durch weitere Proteine und die Kompartimentierung des Organells sind Chloroplasten in der Lage, die Energie des absorbierten Sonnenlichtes zur Synthese von ATP (Graber *et al.*, 1988) und Kohlenhydraten (z. B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat) zu nutzen.

Chloroplasten besitzen die sechs unabhängigen Kompartimente äußere und innere Membran, den Intermembranraum, das Stroma, die Thylakoid-Membran und das Thylakoid-Lumen. Dabei befindet sich der Intermembranraum zwischen der äußeren und inneren Membran und die innere Membran schließt das Stroma ein. Im Stroma wiederum befinden sich die Membran-umschlossenen Thylakoide. Sehr viele der in den Chloroplasten lokalisierten Proteine werden durch den Zellkern kodiert. Diese Proteine müssen also nach ihrer Synthese im Zytosol zielgerichtet transportiert und in die Chloroplasten importiert werden. Wenn der Bestimmungsort eines solchen Proteins das Thylakoid-Lumen ist, muß es insgesamt drei Membranen überqueren.

Ein Teil der Chloroplasten-Proteine wird aber vom Organell-eigenen Chromosom kodiert, das sich im Stroma befindet. Viele dieser im Stroma synthetisierten Proteine werden in bzw. über die innere oder die Thylakoid-Membran transportiert.

## Einleitung

---

Peroxisomen kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. Sie enthalten sehr große Mengen an Enzymen, die an Oxidationsreaktionen beteiligt sind. Unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid werden bei diesen Reaktionen vor allem Fettsäuren über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut.

Peroxisomen werden durch eine Doppellipid-Membran vom Zytosol abgegrenzt und besitzen keine inneren Membransysteme. Da sie auch kein eigenes Genom besitzen, müssen alle peroxisomalen Proteine importiert werden (Lazarow und Fujiki, 1985). Peroxisomale Proteine werden im Zytosol synthetisiert (Bellion und Goodman, 1987) und anschließend zum Organell transportiert. Dieser Proteintransport ist kein Zweig des Sekretorischen Weges. Die anschließende Translokation der Peroxisomen-Proteine in bzw. über die Membran beruht wahrscheinlich auf verschiedenen Mechanismen (Santos *et al.*, 1988).

### 1.1.2 Endomembran-System

Das Endomembran-System ist ein Transportsystem, mit dem Proteine zur PM transportiert oder aus der Zelle geschleust werden können. Es verbindet somit die Zelle mit ihrer Umgebung.

Das Endomembran-System besteht aus verschiedenen Kompartimenten, die jeweils durch eine eigene Membran vom Zytosol und untereinander abgegrenzt werden. Diese Kompartimente sind das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, die Lysosomen (in tierischen Zellen) bzw. Vakuolen (in Pflanzen- und Pilz-Zellen), die Endosomen und die Plasmamembran.

Sekretorische und Membranproteine werden im Sekretorischen Weg, der durch das Endomembran-System verläuft, nach ihrem endgültigen Bestimmungsort durch komplizierte Signal-Rezeptor-Wechselwirkungen sortiert. Der Hauptfluß durch den Sekretorischen Weg trägt lösliche Proteine über das ER und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche. Aber einige Proteine, die in den Sekretorischen Weg gelangen, erreichen nie die Oberfläche, sondern verteilen sich über den ganzen Sekretorischen Weg.

Der Transport wird durch Vesikel ermöglicht. Vesikel sind kleine Membran-umhüllte Organellen, die sich von der jeweiligen Donor-Membran abschnüren, transportiert werden und anschließend mit der entsprechenden Akzeptor-Membran fusionieren. Dabei befinden sich die zu transportierenden Membranproteine in der Vesikelmembran, während sich die löslichen Proteine in deren Lumen aufhalten.

Das ER durchzieht in den meisten Zellen das gesamte Zytosol und ist kontinuierlich mit der Hülle des Zellkerns verbunden. Das ER ist der Eingang zum Endomembran-System. Alle Kompartimente dieses Systems werden vom ER sowohl mit Lipiden als auch mit Proteinen beliefert. Das ER selbst kann in zwei funktionelle Bereiche unterteilt werden. Das glatte ER ist die Hauptstelle der Lipid-Synthese. Lipide könnten einen wichtigen und bisher überwiegend ignorierten Einfluß auf den zielgerichteten Proteintransport haben. Das rauhe ER (rER) ist eine spezialisierte Domäne eines extensiven Netzwerkes. Es ist *per definitionem* der

## Einleitung

---

Teil des kontinuierlichen ER, der wegen der großen Zahl von Membran-gebundenen Ribosomen rauh erscheint (Unwin, 1977). Diese Ribosomen synthetisieren ausschließlich sekretorische oder Membranproteine des Endomembran-Systems. Andere Proteine werden von freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert. Sekretorische Proteine werden vollständig über die ER-Membran transloziert, während Membranproteine in diese Membran inseriert werden. Sowohl die sekretorischen als auch die Membranproteine werden unabhängig von ihrem endgültigen Bestimmungsort innerhalb des Endomembran-Systems zielgerichtet zur rER-Membran transportiert und über die Membran transloziert bzw. in die Membran inseriert. Die sekretorischen Proteine überqueren auf ihrem Transport durch die Zelle nur eine Membran, nämlich die Membran des rER.

Die synthetisierten Proteine können entweder im ER bleiben oder entlang des Sekretorischen Weges, der durch das Endomembran-System führt, transportiert werden. Dabei werden die einzelnen Proteine entsprechend ihres endgültigen Bestimmungsortes entweder durch den gesamten Sekretorischen Weg transportiert oder verbleiben in ihrem jeweiligen Kompartiment. An diejenigen Proteine, die N-Glykosylierungsstellen aufweisen, wird ein Grundgerüst von Oligosacchariden an die entsprechenden Asparagin-Aminosäuren gekoppelt und anschließend durch Glukosidasen und Mannosidasen modifiziert.

Der Transport führt vom ER über das Intermediärkompartiment zum Golgi-Apparat.

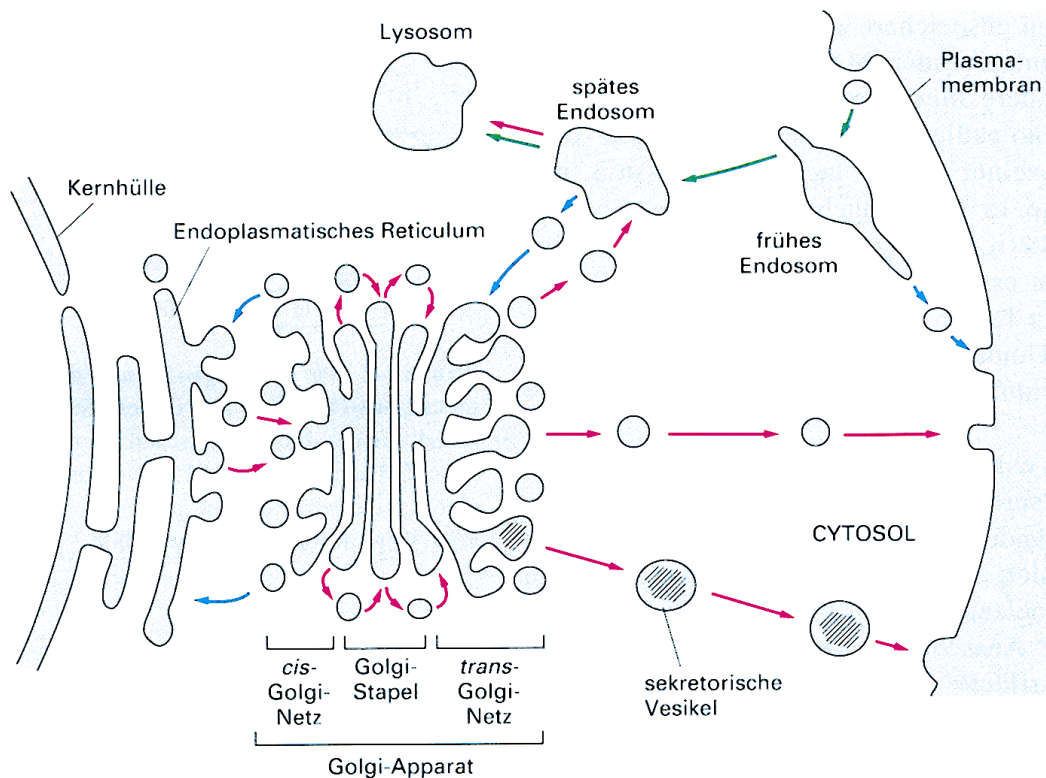
Der Golgi-Apparat ist normalerweise nahe dem Zellkern lokalisiert. Er wird repräsentiert durch eine Serie von drei oder mehr gestapelten Scheiben, die Golgi-Zisternen genannt werden. Individuelle Golgi-Zisternen sind separate, biochemisch und funktionell verschiedene Gebilde, die nach einem sehr strikten Muster organisiert sind. Gemäß ihrer Orientierung zum ER werden die drei Zisternen als *cis*-, medialer und *trans*-Golgi bezeichnet. An den *trans*-Golgi schließt sich das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) an.

An der *cis*-Seite, die dem ER am nächsten ist, fusionieren Vesikel, die sich zuvor vom ER bzw. Intermediärkompartiment abgeschnürt hatten. Die Proteine (und Lipide) dieser Vesikel können über die mediale Zone zur *trans*-Seite weitergeleitet werden. Von der *trans*-Seite kann ein Transport zum TGN erfolgen. Das TGN ist der Ort, an dem die verschiedenen Äste des Sekretorischen Weges auseinander gehen. Es dient daher der weiteren Sortierung der transportierten Proteine (und Lipide). Ein Zweig des Sekretorischen Weges führt vom TGN zu den Lysosomen, während ein anderer Zweig entweder über sekretorische Vesikel oder direkt zur PM führt.

Sekretorische Proteine können beim Durchgang durch den Golgi-Apparat chemisch modifiziert und proteolytisch prozessiert werden. Die für die Modifizierungen und Prozessierungen verantwortlichen Enzyme sind häufig in speziellen Teilen der Zisternen lokalisiert. Die im ER an N-Glykoproteine gekoppelten und modifizierten Oligosaccharide werden im Golgi-Apparat weiter verändert. Mannose-Reste dieser Oligosaccharide werden auf zwei verschiedene Arten modifiziert, abhängig davon, ob die Proteine zu den Lysosomen transportiert werden sollen oder nicht. Damit spielt die Modifizierung von Oligosacchariden auch bei der Sortierung der transportierten Proteine eine wichtige Rolle.

## Einleitung

Ein weiterer Bestandteil des Endomembran-Systems sind die Endosomen. Diese können je nach ihrem Reifestadium aufgeteilt werden in frühe, mittlere und späte Endosomen. Vesikel, die sich in Folge der Endozytose von der PM abschnüren, werden zu den frühen Endosomen transportiert und fusionieren schließlich mit diesen. Die frühen Endosomen stellen ein Sortierungszentrum dar, von welchem verschiedene Rezeptoren, Rezeptor-gebundene Liganden und vielleicht Phospholipide in verschiedene Wege geleitet werden. Dies kann zu einem Transport zurück zur Zelloberfläche, dem Golgi-Apparat oder den Lysosomen führen.



**Abb. 2 Komponenten des Endozytose-Weges und des Sekretorischen Weges**

Jedes Kompartiment umschließt einen Raum, der topologisch der Außenseite der Zelle äquivalent ist. Alle kommunizieren miteinander mit Hilfe von Transportvesikeln. Auf dem Sekretorischen Weg werden Proteine vom ER zur Plasmamembran oder (über späte Endosomen) zu den Lysosomen transportiert. Beim Endozytose-Weg werden Moleküle von Vesikeln aufgenommen, die von der Plasmamembran stammen, und zu den frühen Endosomen und dann (über späte Endosomen) zu den Lysosomen befördert werden. Proteine werden aber auch in entgegengesetzter Richtung zum Beispiel vom Golgi-Apparat zum ER transportiert. (entnommen aus: Alberts, B. *et al.*, 1995)

Die Lysosomen (bzw. die funktionell äquivalente Vakuole) sind das Ende eines Zweiges des Sekretorischen Weges. Wie das ER und der Golgi-Apparat werden sie durch eine Membran begrenzt. Sie enthalten sowohl Proteine, die endozytiert wurden, als auch die meisten degradierenden Enzyme der Zelle (z.B. saure Hydrolasen), die auf dem Sekretorischen Weg zu den Lysosomen transportiert wurden. Die meisten der endozytierten Proteine werden durch degradierende Enzyme abgebaut, die ihr Aktivitätsoptimum bei niedrigen pH-Werten besitzen. Lysosomen besitzen solch einen niedrigen pH-Wert (etwa 4,5 bis 5) (Ohkuma und

## Einleitung

---

Poole, 1978), der durch eine Protonen-ATPase in der lysosomalen Membran aufrecht erhalten wird (Mellman *et al.*, 1986).

Die löslichen lysosomalen Proteine, die auf dem Sekretorischen Weg zu den Lysosomen transportiert werden, tragen phosphorylierte Mannose-Reste. Diese wirken als lysosomale Transportsignale. Die Phosphorylierungsreaktionen der entsprechenden Oligosaccharide werden in verschiedenen *cis*-Golgi-Kompartimenten durchgeführt (Lazzarino und Gabel, 1988).

Die Zelle wird durch eine PM begrenzt, die verhindert, daß zytosolisches Material einschließlich der Proteine in das umgebende Medium entweicht. Spezifische Transportsysteme sind für den Ein- und Austritt von spezifischen Proteinen in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus erforderlich. Die PM bezeichnet das Ende des Sekretorischen Weges. Proteine, die durch den gesamten Weg transportiert wurden, können ein weiteres Mal sortiert werden. Denn die PM von einigen Zellen ist polarisiert (z.B. Epithelzellen) und in zwei verschiedene Domänen unterteilt. Die apikale Oberfläche, die Mikrovilli haben kann, ist zur Außenseite orientiert (bzw. Lumen des Darm). Die basolaterale Oberfläche ist dagegen an der Innenseite lokalisiert. Sie ist gegen die basolaterale Oberfläche von anderen Zellen oder die extrazelluläre Matrix gerichtet. Die meisten apikalen und basolateralen Proteine werden nach entsprechender Sortierung direkt zu ihrer Zielmembran transportiert.

Das definierende Merkmal von eukaryontischen Zellen ist der Zellkern, der das zelluläre Genom enthält. Fast sämtliche Proteine der Zelle werden durch die DNS im Zellkern kodiert. Der Zellkern ist von einer Doppelmembran, der nuklären Hülle, umgeben. Da die ER-Membran in die Hülle des Zellkerns übergeht und diese bildet, gehört dieses Kompartiment zum Endomembran-System. Die nukläre Hülle trennt das Nukleoplasma vom Zytoplasma. Die Proteine des Nukleoplasmas werden aber nicht über das Endomembran-System transportiert. Statt dessen transportiert ein spezifisches Transportsystem diese Proteine durch die nuklären Porenkomplexe (NPCs), die sich in der nuklären Hülle befinden, vom Zyto- zum Nukleoplasma (Feldherr *et al.*, 1984). Proteine werden aber auch in umgekehrter Richtung transportiert. Auf welche Weise Membranproteine in die Zellkern-Hülle inseriert werden, ist nicht bekannt.

### 1.2 Signalsequenzen vermitteln den zielgerichteten Transport

Der Ort der Biosynthese sehr vieler Proteine, die für ein bestimmtes Kompartiment spezifisch sind, stimmt nicht mit dem Ort überein, an dem sie wirken. Diese Proteine werden daher zielgerichtet transportiert und können anschließend zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort exportiert oder importiert werden. Da verschiedene Proteine zu verschiedenen Orten transportiert werden, müssen sie entsprechend sortiert werden.

## Einleitung

---

Als gemeinsames Prinzip tragen die von Export- und Importsystemen transportierten Proteine gewöhnlich ein N-terminales Signal. Dieses N-terminale Signal ist Teil des zu transportierenden Proteins und wird Signal-, Führer- oder Pre-Sequenz genannt (Attardi und Schatz, 1988; Blobel, 1980; Verner und Schatz, 1988). Proteine, die dieses Signal besitzen, werden Pre-Proteine genannt. In dieser Arbeit wird für dieses N-terminale Signal der Begriff Signalsequenz (SS) verwendet.

Der zielgerichtete Transport und damit die Sortierung von Proteinen wird durch das Zusammenspiel von diesen Signalsequenzen und spezifischen Rezeptoren ermöglicht (Schatz, 1986). In Eukaryonten sind sie in den Protein-translozierenden Membranen lokalisiert. Die bekannten Rezeptoren sind integrale Membranproteine mit zytosolisch exponierten Domänen, die entweder Signalsequenzen oder Pre-Proteine, welche an einen zytosolischen Faktor gebunden sind, erkennen. Die spezifische Wechselwirkung der Signalsequenz oder des Pre-Proteins mit dem Membran-Rezeptor entläßt den zytosolischen Faktor und dirigiert die Signalsequenz des Proteins in einen Translokationskanal. Die bekannten Translokationskanäle bestehen aus integralen Membran-Proteinen, die einen hydrophilen, hetero-oligomeren Kanal bilden. Die Wechselwirkungen zwischen dem Translokationskanal und den Rezeptoren an der Ziellmembran sind wahrscheinlich dynamischer Natur (Kiebler *et al.*, 1993; Walter und Johnson, 1994). Ein gegebener Kanal scheint daher vielen verschiedenen Rezeptoren dienen zu können. Die Dissoziation der SS vom Rezeptor kann durch die Hydrolyse von ATP oder GTP kontrolliert sein. Die Proteine werden anschließend mit Hilfe dieses Kanals in bzw. über die jeweilige Membran transloziert. Die Translokation der Proteine erfolgt also normalerweise nicht direkt durch die Lipiddoppelschicht der Membranen.

Das zu translozierende Protein bleibt häufig während des Transports wenigstens teilweise ungefalteter. Nach erfolgter Translokation faltet das Protein sich dann auf der *trans*-Seite der Membran mit der Hilfe von Faltungsenzymen, die Chaperone genannt werden. Chaperone sind Proteine, die mit nicht-nativen Konformationen anderer Proteine wechselwirken. Dadurch verhindern sie die Aggregation von neu synthetisierten Proteinen. Eine bedeutende Klasse von Chaperonen sind die Mitglieder der Hsp70-Familie.

Die Energie für die Translokation von Proteinen in oder über Membranen kann durch einen peripher am Kanal assoziierten Protein-Translokationsmotor bereit gestellt werden, der Nukleosid-Triphosphate hydrolysiert. In Bakterien und Mitochondrien werden diese Motoren durch ein elektrochemisches Potential über der Membran unterstützt (Wickner *et al.*, 1991).

Da Protein-translozierende Membranen generell nicht die passive Diffusion von Ionen erlauben, darf der Translokationskanal nur dann öffnen, wenn eine Polypeptidkette transloziert wird. Diese Öffnung des Kanals könnte durch die jeweilige SS kontrolliert werden (Emr *et al.*, 1981; Jungnickel und Rapoport, 1995; Simon und Blobel, 1991; Simon und Blobel, 1992).

Die Wichtigkeit der SS für die richtige Lokalisierung von vielen Proteinen wird am Beispiel der Invertase in der Hefe *S. cerevisiae* deutlich, die in zwei Isoformen vorkommt. Eine Form besitzt eine N-terminale SS und wird sekretiert, während die andere Form im Zytosol

## Einleitung

---

lokalisiert ist. Die zytosolische Invertase unterscheidet sich in ihrer Aminosäure-Sequenz von der sekretierten Form lediglich durch das Fehlen der SS (Carlson und Botstein, 1982; Carlson *et al.*, 1983; Perlman *et al.*, 1982).

Ein weiteres Protein (ADH3) wird in *S. cerevisiae* durch das Genom sowohl mit als auch ohne N-terminale SS kodiert (Young und Pilgrim, 1985). Das Pre-Protein ist im Mitochondrium, das Protein ohne N-terminale SS im Zytosol lokalisiert.

Es gibt auch Proteine, die zwei oder mehrere SS besitzen. Der Import von Proteinen vom Zytosol in die Thylakoide, in den mitochondrialen Intermembranraum oder in die mitochondriale Außenmembran wird häufig beeinflusst durch eine N-terminale SS, der wiederum eine Export-SS folgt.

### 1.2.1 Proteinimport

Proteine, die im Zytosol synthetisiert werden, können in ein bestimmtes Kompartiment importiert werden. Peroxisomen werden von einer einzelnen Membran umgeben, die deren Matrix einschließt. Sie besitzen kein eigenes Genom. Alle peroxisomalen Proteine werden von der DNS im Zellkern kodiert und im Zytosol synthetisiert. Der Import von peroxisomalen Proteinen aus dem Zytosol besitzt keine auffallenden Parallelen zum Transport von Proteinen über die Membranen von ER, Mitochondrien oder Chloroplasten. Ein auffallender Unterschied zwischen peroxisomalem Proteinimport und dem Import in andere Organellen ist, daß Peroxisomen den Import von gefalteten, oligomerisierten Proteinen erlauben.

Neben dem zellulären Genom haben nur Mitochondrien und Chloroplasten ein eigenes Genom, das ihnen erlaubt, einige ihrer eigenen Proteine zu synthetisieren. Diese Proteine bleiben entweder am Ort ihrer Synthese (Mitochondrien-Matrix bzw. Chloroplasten-Stroma) oder werden zur inneren Mitochondrien-Membran oder zum Intermembranraum bzw. zur inneren Chloroplasten-Membran, Thylakoid-Membran oder dem Thylakoid-Lumen transportiert. In Analogie zum zielgerichteten Transport des Sekretorischen Weges werden auch bei diesen Proteinen spezielle Signale innerhalb der Sequenz des transportierten Proteins verwendet. Alle anderen Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten werden von der DNS im Zellkern kodiert und vom Zytosol unter Vermittlung von spezifischen Transportsignalen in diese Organellen transportiert. Dabei müssen sie bis zu drei Membranen überwinden, um ihre endgültigen Bestimmungsorte zu erreichen.

Als gemeinsames Merkmal sind Importsequenzen von Mitochondrien und Chloroplasten etwa 20 bis 40 Aminosäuren lang, eher hydrophil und reich an hydroxylierten Aminosäuren. Die peroxisomalen Importsequenzen weichen von diesem Prinzip ab.

## Einleitung

---

### 1.2.1.1 Peroxisomen

Die peroxisomalen Proteine werden im Zytosol von freien Ribosomen synthetisiert (Bellion und Goodman, 1987; Lazarow und Fujiki, 1985). Bei den meisten dieser Proteine handelt es sich aber nicht um Pre-Proteine, die nach ihrer Synthese prozessiert werden (Clayton, 1987; Rachubinski *et al.*, 1984). Peroxisomale Proteine können sowohl in die Membran inseriert als auch über die Membran in die Peroxisomen-Matrix transloziert werden. Die meisten Proteine, die in die peroxisomale Matrix importiert werden, tragen am C-Terminus das Ser-Lys-Leu-Tripeptid oder eng verwandte Tripeptide, die kollektiv PTS1 (peroxisome targeting signal) genannt werden. Andere importierte Proteine tragen ein N-terminales Nonapeptid, das aus einem wenig definierten Konsensus-Motiv besteht (PTS2). Daneben gibt es weitere unidentifizierte Importsignale (Heinemann und Just, 1992; Rachubinski und Subramani, 1995). Außerdem können Proteine in die Peroxisomen-Matrix gelangen, ohne selbst ein Importsignal zu besitzen. Diese Proteine bilden im Zytosol einen Komplex mit PTS-Proteinen und werden mit diesen über die Peroxisomen-Membran transloziert (Glover *et al.*, 1994; McNew und Goodman, 1994; Walton *et al.*, 1995).

Proteine, die PTS1- bzw. PTS2-Signale enthalten, werden durch die entsprechenden Rezeptoren Pex5p bzw. Pex7p erkannt und gebunden (Rachubinski und Subramani, 1995). In einigen Eukaryonten einschließlich der Säuger sind diese Rezeptoren vorwiegend im Zytosol lokalisiert (Dodt *et al.*, 1995; Dodt und Gould, 1996; Wiemer *et al.*, 1995). Pex5p und Pex7p binden anschließend über einen Komplex von Membran-gebundenen Proteinen an die Peroxisomen (Chang *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001; Okumoto *et al.*, 2000; Subramani *et al.*, 2000). Der Komplex aus PTS-Protein und Rezeptor wird anschließend an einen Translokationskanal übergeben, der noch nicht eindeutig identifiziert wurde. Daran schließt sich die eigentliche Translokation über die Membran in die Peroxisomen-Matrix an. Der PTS1-Rezeptor Pex5p könnte dabei ebenfalls in die Peroxisomen-Matrix gelangen und nach Dissoziation vom PTS1-Protein wieder ins Zytosol exportiert werden (Dammai und Subramani, 2001).

### 1.2.1.2 Mitochondrien

Der Import von Proteinen in Mitochondrien kann sowohl ko- als auch posttranslational erfolgen. In wachsenden Zellen sind die Oberflächen von Mitochondrien durch Polysomen bedeckt, die kotranslational mitochondriale Proteine translozieren (Suisa und Schatz, 1982). Der Import der meisten Proteine ist aber unabhängig von der Proteinsynthese und geschieht damit posttranslational.

Der Transport von Proteinen in die Mitochondrien-Matrix wird durch deren Import-SS vermittelt. Mitochondriale Import-SS sind zusätzlich zu den allgemeinen Merkmalen reich an basischen Aminosäuren, haben meist keine sauren Aminosäuren und können eine amphiphile  $\alpha$ -Helix oder ein  $\beta$ -Faltblatt bilden (Roise und Schatz, 1988; Theg und Geske, 1992; von



## Einleitung

---

Heijne, 1986b). Dieser basische und amphiphile Charakter ist essentiell für die Funktion der mitochondrialen Import-SS.

Die Translokation von Proteinen in bzw. über die äußere und innere Membran von Mitochondrien erfordert Komplexe integraler Proteine sowohl in der inneren (Tim = translocase of the inner mitochondrial membrane) als auch der äußeren (Tom = translocase of the outer mitochondrial membrane) Membran. Zusätzlich ist für die Translokation von Proteinen in die Mitochondrien-Matrix ein in der Matrix lokalisiertes mHsp70 (mitochondriales Hsp70) notwendig.

Der zielgerichtete Transport von Proteinen zur äußeren Mitochondrien-Membran kann auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Zwei sehr saure Tom-Untereinheiten können direkt an die basische und amphiphile mitochondriale SS binden (Haucke *et al.*, 1996; Haucke *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1995). Alternativ kann das zytosolische Chaperon MSF (mitochondrialer Import-stimulierender Faktor) ATP-abhängig das Pre-Protein und einen Tom-Rezeptor auf der Mitochondrien-Oberfläche binden und das Pre-Protein anschließend in den Importkanal innerhalb der mitochondrialen Außenmembran entlassen (Hachiya *et al.*, 1993; Hachiya *et al.*, 1995).

Die SS des Pre-Proteins wird in beiden Fällen letztlich einem Tom-Import-Rezeptor übergeben. Dieser besitzt eine kleine saure Domäne, die sich in den Intermembranraum erstreckt und eine hohe Affinität für mitochondriale SS besitzt. Sobald die SS eines Proteins, das in ein internes Kompartiment transportiert werden soll, den Intermembranraum erreicht hat, könnte es durch den Tim-Komplex übernommen werden. Diese Übernahme wird initiiert durch das elektrische Potential über der Membran, das elektrophoretisch die positiv geladene SS durch die innere Membran zieht (Martin *et al.*, 1991; Roise, 1992). Zusätzlich kann das mHsp70 auf der *trans*-Seite der Membran mit der translozierenden Polypeptidkette wechselwirken und sie nach Hydrolyse von ATP durch die innere Membran in die Mitochondrien-Matrix ziehen.

Einige Proteine besitzen für den Transport in Mitochondrien Tandem-Sequenzen. Dabei dirigiert die Import-SS das Protein zum Mitochondrium und eine sogenannte Stop-Transfer-SS stoppt die Translokation entweder in der inneren oder äußeren Membran. Das Protein ist damit über diese Stop-Transfer-SS in der Membran verankert.

Ein Protein, das ursprünglich in die innere Membran inseriert wurde, könnte durch proteolytische Spaltung in den Intermembranraum als lösliches Protein entlassen werden (Hahne *et al.*, 1994; Hartl und Neupert, 1990; Keegstra, 1989; Nguyen *et al.*, 1988). Damit besitzen Mitochondrien ein Translokationssystem, mit dem Membranproteine sowohl in die äußere bzw. innere Membran inseriert als auch lösliche Proteine in den Intermembranraum bzw. in die Matrix entlassen werden können.

Mitochondrien besitzen auch Exportsysteme. Diese scheinen Mitochondrien-kodierte Proteine, die durch Ribosomen in der Matrix synthetisiert werden, in die innere Membran zu inserieren (Attardi und Schatz, 1988; Blobel, 1980). Es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß

## Einleitung

---

sie Proteine in den Intermembranraum exportieren. Einige dieser Proteine werden als Pre-Protein mit einem N-terminalen Matrix-Exportsignal synthetisiert (Pratje und Guiard, 1986).

### 1.2.1.3 Chloroplasten

Die meisten Chloroplasten-Proteine werden durch die DNS im Zellkern kodiert. Sie werden durch Ribosomen im Zytosol synthetisiert und müssen zielgerichtet zu den Chloroplasten transportiert und anschließend über bzw. in die einzelnen Chloroplasten-Membranen transloziert bzw. inseriert werden. Da sich auf der Oberfläche von Chloroplasten keine assoziierten Polysomen befinden geschieht der Proteinimport hier vermutlich ausschließlich posttranslational (Dobberstein *et al.*, 1977). Die meisten Chloroplasten-Proteine besitzen ein spezifisches Signal, das sich meist am N-Terminus des Pre-Proteins befindet und notwendig für die posttranslationale Translokation des Pre-Proteins über die Chloroplasten-Membranen ist. Einige Proteine besitzen ein Signal für die Insertion in die äußere Membran, während die meisten Proteine ein bestimmtes Signal enthalten, das sie ins Chloroplasten-Stroma dirigiert. Alle Proteine, die eine Chloroplasten-SS enthalten, werden entlang des sogenannten generellen Importweges importiert.

Die SS von Chloroplasten-Pre-Proteinen besitzen eine ungewöhnliche Eigenschaft. Sie können durch eine zytosolische Serin/Threonin Proteinkinase phosphoryliert werden (Waegemann und Soll, 1996). Das Phosphorylierungsmotiv befindet sich in den meisten oder vielleicht sogar allen SS von Chloroplasten-Pre-Proteinen. Die Phosphorylierung führt zur Bildung eines hetero-oligomeren Komplexes, der Steuerungskomplex genannt wird. Das Pre-Protein kann durch diesen zytosolischen Steuerungskomplex zur Chloroplasten-Membran gebracht werden (May und Soll, 2000). Nach der Entlassung des Pre-Proteins vom Steuerungskomplex bindet es schließlich an einen Importrezeptor, der im Vergleich zu einem nicht-phosphorylierten ein phosphoryliertes Pre-Protein mit einer sehr viel höheren Affinität bindet. Die SS muß vor dem Eintritt in den Translokationskanal dephosphoryliert werden, da sie sonst nicht in den Translokationskanal inseriert wird (Waegemann und Soll, 1996). Das Protein wird unter Verwendung des Toc- bzw. Tic-Komplexes (Toc/Tic: translocon of the outer/inner envelope of chloroplasts) über die äußere bzw. innere Membran und anschließend durch einen unbekannten Kanal ins Stroma transloziert. Im Stroma wird das Pre-Protein durch verschiedene Chaperone erkannt und die SS durch eine Metallopeptidase abgespaltet, die das generelle Prozessierungsenzym der Chloroplasten darstellt (Richter und Lamppa, 1998). Die Translokation in das Stroma erfordert somit das Zusammenspiel von Proteinkomplexen in der äußeren und inneren Membran und lösliche Proteine im Intermembranraum und im Stroma.

Chloroplasten besitzen innerhalb der inneren Membran ein weiteres Membran-umgebenes Kompartiment, das Thylakoid genannt wird. Beim Lumen der Thylakoide handelt es sich um ein extrazytisches Kompartiment. Daher wird der Transport von Proteinen vom Stroma ins Thylakoid-Lumen als Export bezeichnet.

Durch die Abspaltung der SS, die das Pre-Protein ins Stroma dirigiert hat, kann am neuen N-Terminus des Proteins eine Export-SS freigelegt werden. Diese Export-SS kann den

## Einleitung

---

Transport des Proteins in die Thylakoide vermitteln. Bei einem System für den Stroma-Thylakoid-Transport ist ein GTP-bindender Komplex beteiligt, der SRP (signal recognition particle) genannt wird (Franklin und Hoffman, 1993; Li *et al.*, 1995). Einige Proteine verwenden aber auch einen SRP-unabhängigen Transportweg. Dieser wird durch einen pH-Gradienten angetrieben (Cline *et al.*, 1993; Martoglio *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1993). Ein weiteres dieser Systeme ist das mit den bakteriellen Transportsystem verwandte TAT (twin-arginine translocation). Es verwendet ähnliche Komponenten (Mori *et al.*, 1999; Settles *et al.*, 1997) und ähnliche Signale für den zielgerichteten Transport wie Bakterien (Chaddock *et al.*, 1995). Im Gegensatz zum bakteriellen System binden die Proteine für die Thylakoide aber keine Kofaktoren (Berks *et al.*, 2000).

Sowohl Chlorplasten-kodierte Proteine als auch Proteine, die zuvor in das Stroma importiert wurden, können durch diese Exportsysteme in die Thylakoid-Membran, das Thylakoid-Lumen und vielleicht auch in die innere Chloroplasten-Membran transportiert werden (Gillham *et al.*, 1994; Rochaix, 1992).

Insgesamt führen vier verschiedene Wege zur Insertion in oder Translokation über die Thylakoid-Membran (Dalbey und Robinson, 1999; Keegstra und Cline, 1999). Die Export-SS bestimmt dabei wahrscheinlich, welches Transportsystem verwendet wird (Chaddock *et al.*, 1995; Walter und Johnson, 1994).

### 1.2.2 Proteinexport

Export-SS sind im Gegensatz zu den Import-SS hydrophob. Sie vermitteln den Transport über die bakterielle PM, in das ER, in die Chloroplasten-Thylakoide und die innere Mitochondrien-Membran.

Diese SS befinden sich meist am N-Terminus der entsprechenden Pre-Proteine und vermitteln den zielgerichteten Transport zu der jeweiligen Ziellmembran. Dabei können verschiedene Wege benutzt werden, die wahrscheinlich an einem einzigen Translokationskanal zusammen treffen.

#### 1.2.2.1 Die Plasmamembran von *E. coli*

Bakterien exportieren Proteine in ihre bakterielle Plasmamembran (bPM) und sekretieren sie über diese Membran durch einen Prozeß, der den ersten Schritten des Sekretorischen Weges in Eukaryonten ähnlich ist. Auch hier scheint die SS die Ribosomen zur bPM zu dirigieren (Rasmussen und Bassford, 1985). Proteine, die über die bPM transloziert werden, erreichen entweder das umgebende Medium (bei Gram-positiven Bakterien) oder das Periplasma (bei Gram-negativen Bakterien).

Für den Proteinexport über die PM von *E. coli* existieren mindestens drei Systeme.

1.) Bei dem ersten System werden die Proteine SecA und SecB verwendet. SecB ist ein Chaperon, das bisher nur in Prokaryonten gefunden wurde. Es bindet ATP-abhängig Bereiche

## Einleitung

basischer Aminosäuren und apolare Regionen von Pre-Proteinen. Diese Pre-Proteine werden zum Membran-gebundenen SecA gebracht (Diamond *et al.*, 1995; Hardy und Randall, 1991).

2.) Bei dem zweiten System werden das Protein FtsY und der SRP-Komplex verwendet (Luirink *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). Das bakterielle SRP ist ein zytosolisches Ribonukleoprotein, das aus einer 4,5 S RNS und einem Protein besteht. Die Proteinkomponente wird Ffh (Fifty-four-homolog) genannt, da es zum eukaryontischen SRP54 homolog ist.

3.) Bei dem dritten System wird die hydrophobe Region innerhalb der SS erkannt, die N-terminal zusätzlich ein RR-Motiv besitzt. Daher wird dieses System TAT (twin arginine translocation) genannt.

Bei dem ersten Transportsystem kann das Pre-Protein, das in oder über die Membran der Plasmamembran transloziert werden soll, von SecB gebunden werden. SecB bindet anschließend spezifisch an die SecA-Untereinheit der Transportmaschinerie in der bPM, wodurch das gebundene Pre-Protein zum Membran-assoziierten SecYEG-Komplex gelangt. Der SecYEG-Komplex ist ein Heterotrimer, das aus den Proteinen SecY, SecE und SecG besteht und den Translokationskanal bildet. Die Proteine des SecYEG-Komplexes sind den drei Komponenten des eukaryontischen Sec61-Komplexes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) in Bezug auf die Sequenzen ähnlich (Hartmann *et al.*, 1994). Der SecYEG-Komplex arbeitet in der Translokation von Proteinen mit SecA und den Membranproteinen SecD und SecF zusammen (Douville *et al.*, 1995; Nishiyama *et al.*, 1994; Wickner *et al.*, 1991).

Durch Wechselwirkung des Pre-Protein-SecB-Komplexes mit SecA, wird das Pre-Protein vom SecB entlassen. Das SecA kann aber auch direkt das Pre-Protein ohne Vermittlung von SecB binden. Das SecA erkennt die SS des Pre-Proteins, dessen ungefaltete reife Regionen und SecB (Douville *et al.*, 1995; Nishiyama *et al.*, 1994). SecA, das auf der *cis*-Seite der Membran gebunden ist, treibt durch ATP-Hydrolyse den Proteintransport durch den bakteriellen Translokationskanal an (Economou *et al.*, 1995; Economou und Wickner, 1994; Kim *et al.*, 1994; Schekman, 1994). Der Translokationsprozeß wird zusätzlich durch ein elektrochemisches Potential unterstützt.

Die SS des Pre-Proteins könnte in *E. coli* bei verschiedenen Schritten innerhalb des Transportprozesses wirken. Sie könnte die Faltung des Proteins nach dessen Synthese verlangsamen, wodurch das Protein über seinen reifen Teil an das Chaperon SecB bindet. Zusätzlich könnte die SS mit der Membran-assoziierten Exportmaschinerie wechselwirken und diese aktivieren. Die SS wäre nach diesem Mechanismus ein Faltungsinhibitor und eine Markierung, woran die Transportmaschine das zu transportierende Protein erkennt (Diamond *et al.*, 1995; Hardy und Randall, 1991; Wickner, 1988). Die SS könnte außerdem über eine mögliche spezifische Wechselwirkung mit dem SecY-Protein die Translokation beeinflussen (Emr *et al.*, 1981).

Elektrophysiologische Untersuchungen haben Kanäle in der *E. coli* bPM detektiert, die spezifisch durch ein translozierendes Polypeptid geblockt oder durch chemisch synthetisierte Signalpeptide geöffnet werden (Simon und Blobel, 1991; Simon und Blobel, 1992). Dies

## Einleitung

---

spricht dafür, daß die SS den Translokationskanal für das zu translozierende Pre-Protein öffnen könnte.

Bei dem zweiten Translokationssystem spielen die GTPasen SRP und FtsY eine wichtige Rolle. Das bakterielle SRP bindet die SS eines naszierenden sekretorischen Proteins und der resultierende Komplex aus naszierender Kette, Ribosom und SRP bindet GTP-abhängig an FtsY. FtsY ist ein lösliches Protein, das zur eukaryontischen SR  $\alpha$ -Untereinheit homolog ist. Nach dem Transport dieses Komplexes zur bPM wird das gebundene Pre-Protein von SRP entlassen. Dieser streng geregelte Mechanismus wird durch die Hydrolyse von GTP kontrolliert. Die eigentliche Translokation des Pre-Proteins über die bPM wird durch ein elektrochemisches Potential über der Membran unterstützt (Attardi und Schatz, 1988; Blobel, 1980; Verner und Schatz, 1988; Wickner *et al.*, 1991). Der dabei verwendete Translokationskanal entspricht wahrscheinlich dem SecYEG-Komplex.

Bei dem dritten Translokationssystem werden gefaltete Proteine mit ihren gebundenen Kofaktoren transportiert. Proteine, die N-terminal von der hydrophoben Region der SS ein RR-Motiv besitzen, werden durch dieses System über die bPM transloziert (Sargent *et al.*, 1998). Der bei diesem System verwendete Translokationskanal ist jedoch nicht SecYEG.

Jedes dieser drei Transportsysteme vermittelt den Transport von nur einem Teil der sekretorischen Proteine. Die Wahl des benutzen Systems hängt wahrscheinlich auch von der jeweiligen SS ab.

### 1.2.2.2 Der Sekretorische Weg in Eukaryonten

In Eukaryonten können Proteine, die über oder in die Membran des ER transloziert werden, für den zielgerichteten Transport zwei verschiedene Systeme verwenden, die beide denselben Translokationskanal benutzen (Rapoport *et al.*, 1996). Das erste System ist abhängig von SRP (signal recognition particle), während das zweite System SRP-unabhängig funktioniert (Walter und Johnson, 1994). Die SRP-abhängige Translokation geschieht in Eukaryonten kotranslational, während die posttranslationale Translokation SRP-unabhängig erfolgen kann. Dabei bestimmt wahrscheinlich die SS der zu transportierenden Proteine, welches dieser beiden Transportsysteme verwendet wird.

## 1.3 ER-spezifische Signalsequenzen

Die meisten SS sind spezifisch für ein bestimmtes Transportsystem. Es gibt aber auch SS, die den Transport zu mehr als einem Kompartiment vermitteln (Brink *et al.*, 1994; Creissen *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1990; Hurt *et al.*, 1986). Bis zu 25% von zufällig synthetisierten Peptiden können als SS fungieren (Baker und Schatz, 1987; Kaiser *et al.*, 1987; Lemire *et al.*, 1989;

## Einleitung

---

Vassarotti *et al.*, 1987b). Daher wird angenommen, daß SS eine hoch-degenerative Primärsequenz besitzen (Kaiser *et al.*, 1987) und daß ihre spezifischen Eigenschaften durch eine gemeinsame Sekundärstruktur oder eine ähnliche Verteilung von geladenen und apolaren Aminosäuren reflektiert werden.

### 1.3.1 Struktur der Signalsequenzen

So gut wie keine der bisher charakterisierten SS (Watson, 1984) haben exakt dieselbe Sequenz gemeinsam. Durch den Vergleich vieler SS wurden deren Charakteristika definiert (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne, 1985; von Heijne, 1986c), die mehr oder weniger von allen SS geteilt werden.

SS sind ausschließlich N-terminal lokalisiert und besitzen eine Gesamtlänge von 15 bis 35 AS. Es sind aber auch erheblich längere SS bekannt. SS bestehen aus drei verschiedenen Regionen (von Heijne, 1985). Die n-Region besitzt eine positive Gesamtladung und ist in ihrer Länge und Aminosäure-Komposition variabel. Die zentrale h-Region ist reich an hydrophoben Aminosäuren, variabel in ihrer Länge und bildet wahrscheinlich eine  $\alpha$ -Helix (Gierasch, 1989). Die c-Region ist kleiner und polarer als die h-Region und enthält die eine Hälfte der spezifischen Spaltungsstelle. Diese Spaltungsstelle, die von einer Signalpeptidase (SPase) erkannt wird, besitzt in den Positionen -1 und -3 kleine und nicht-polare Aminosäuren wie zum Beispiel Alanin (a-X-a, wobei X kein Prolin sein darf).

Aber nur wenige SS zeigen alle dieser Charakteristika. Die Gesamtlängen von SS sind sehr variabel, wobei längere SS normalerweise eine ausgedehnte N-terminale basische Region besitzen. Die n-Region der meisten SS besteht nur aus wenigen Aminosäuren. Aber einige SS haben verlängerte n-Regionen von bis zu 150 Aminosäuren. Die Funktion von solch langen n-Regionen ist bisher nicht bekannt.

Ein zentraler Bereich von neun oder mehr hydrophoben Aminosäuren und eine SPase-Spaltungsstelle bilden somit eine funktionelle eukaryontische SS.

### 1.3.2 Kotranslationale Translokation

Die meisten eukaryontischen sekretorischen Pre-Proteine überqueren die rER-Membran als naszierende Polypeptidketten, während die Translation durch Membran-assoziierte Polysomen fortgeführt wird. Dieser Prozeß geschieht also kotranslational und ist abhängig von SRP.

Eukaryontisches SRP ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, der aus einer 7 S RNS und sechs Proteinen besteht (Walter und Blobel, 1980; Walter und Blobel, 1982), wovon das SRP54 eine GTPase-Aktivität besitzt. Es ist essentiell für den zielgerichteten Transport der meisten sekretierten und integralen Membranproteine zum rER von Säugern (Muller und Zimmermann, 1988; Müller und Zimmermann, 1987). SRP ist lose mit dem rER und Ribosomen assoziiert und kommt frei im Zytosol vor. Es bindet im Zytosol sowohl an das

## Einleitung

---

Ribosom als auch an die SS der naszierenden Polypeptidkette von sekretorischen Proteinen, sobald diese aus dem Ribosom austritt. SRP54 wechselwirkt dabei mit der SS über eine hydrophobe Region, die an sehr unterschiedliche SS binden kann (Keenan *et al.*, 1998). Die Spezifität dieser Wechselwirkung hängt vom Ribosomen-assoziierten heterodimeren NAC (nascent-polypeptide-associated complex) ab. Dieser Komplex bindet präferentiell an SS-freie naszierende Polypeptidketten und hält SRP von der Bindung an solche naszierenden Ketten ab (Wiedmann *et al.*, 1994). Die Effizienz der SRP-SS-Wechselwirkung nimmt ab, je länger die naszierende Polypeptidkette wird (Ainger und Meyer, 1986).

Nach Bindung der naszierenden Polypeptidkette und des Ribosoms bindet SRP GTP und arretiert die weitere Verlängerung der Kette, bis der Komplex aus naszierender Polypeptidkette, Ribosom und SRP an den SRP-Rezeptor auf der ER-Membran bindet (Walter und Blobel, 1981; Walter und Johnson, 1994). Diese Arretierung stellt eigentlich eine Verlangsamung der Translation dar, deren Ausmaß von der mRNA abhängt (Lipp *et al.*, 1987). Durch die Wechselwirkung von SRP mit dem SRP-Rezeptor ist der zielgerichtete Transport des Komplexes aus naszierender Polypeptidkette und Ribosom an die ER-Membran abgeschlossen.

Die drei Funktionen des SRP bestehen also in der SS-Erkennung, der Translationsverlangsamung und dem Rezeptor-vermittelten zielgerichteten Transport zur rER-Membran.

Der SRP-Rezeptor (SR) ist ein heterodimerer Komplex in der ER-Membran. Er besteht aus einer Membran-integrierten  $\beta$ -Untereinheit und einer an diese Untereinheit peripher assoziierten zyttoplasmatischen  $\alpha$ -Untereinheit (docking protein DP), die ebenfalls GTPase-Aktivitäten besitzen (Lauffer *et al.*, 1985; Tajima *et al.*, 1986; Walter und Johnson, 1994).

Die Bindung von SRP an SR löst die Hydrolyse von GTP sowohl in SRP als auch in SR aus. Diese Kaskade der Hydrolyse stellt eine enge zeitliche und räumliche Kopplung zwischen Translation und Membran-Translokation sicher und erlaubt die Dissoziation des SRP von der naszierenden Polypeptidkette. Die wachsende Kette geht direkt vom Ribosom in den Translokationskanal über (Crowley *et al.*, 1993; Gilmore, 1993; Johnson, 1993). Dabei bindet das Ribosom dicht an das ER durch spezifische Wechselwirkungen mit dem Translokationskanal und vielleicht zusätzlichen "Ribosom-Rezeptoren" (Jungnickel *et al.*, 1994; Savitz und Meyer, 1993).

Der Translokationskanal wird durch den Sec61-Komplex gebildet und ist in seinem Inneren hydrophil (Crowley *et al.*, 1993; Gilmore, 1993; Johnson, 1993; Martoglio *et al.*, 1995). Er bildet sich wahrscheinlich um die naszierende Polypeptidkette herum, sobald sie in die Membran eindringt (Singer *et al.*, 1987a). Die SS des translozierenden Proteins könnte dabei als eine Schleife oder "umgekehrte Haarnadel" in die Membran inseriert werden (Inouye und Halegoua, 1980), so daß ihr N-Terminus dem Zytosol zugewandt ist und der C-Terminus des Proteins durch das Ribosom verlängert wird. Die SS ist während der Translokation sowohl in Kontakt mit der Sec61 $\alpha$ -Untereinheit des Kanals als auch mit Membran-Lipiden (Martoglio *et al.*, 1995). Sie kann auch mit dem TRAM-Protein assoziieren (translocating nascent polypeptide-associated membrane protein) (Mothes *et al.*, 1997; Voigt *et al.*, 1996), das in der

## Einleitung

---

Translokation von einigen Proteinen beteiligt ist. Die Wechselwirkung der SS mit dem Sec61-Komplex könnte auch die Entfernung des Chaperons BiP von der luminalen Seite des Translokons induzieren, um den Zugang der naszierenden Kette zum ER-Lumen zu erlauben (Crowley *et al.*, 1994; Hamman *et al.*, 1998). Hydrophobe (Stop-Transfer oder Anker-) Sequenzen in sekretorischen Polypeptiden könnten die Dissoziation oder das laterale Öffnen des Kanals verursachen und damit die Ankersequenz in die hydrophobe Umgebung der Doppellipidschicht entlassen (Singer *et al.*, 1987b). Die Kettenverlängerung wird nach der Dissoziation des SRP reinitiiert und das naszierende Polypeptid durch den Sec61-Kanal transloziert.

Während oder kurz nach der Translokation des naszierenden Polypeptides kann die N-terminale SS auf der luminalen Seite der ER-Membran abgespaltet werden (Blobel und Dobberstein, 1975). Aus dieser Spaltung resultieren die abgespaltete SS, die in der Membran inseriert ist und das lösliche Protein im ER-Lumen. Die abgespaltete SS kann anschließend durch eine Signalpeptidpeptidase (SPPase) weiter gespaltet werden (Lyko *et al.*, 1995; Martoglio *et al.*, 1997). Eine Ausnahme von diesem Prinzip besteht im Pre-Kapsidprotein des Hepatitis B Virus, das nach der SS-Abspaltung sowohl ins ER-Lumen als auch ins Zytoplasma entlassen wird (Garcia *et al.*, 1988; Ou *et al.*, 1989).

### 1.3.3 Posttranslationale Translokation

Eine kleine Anzahl von eukaryontischen sekretorischen Polypeptiden kann posttranslational über einen SRP-unabhängigen Weg zielgerichtet zum ER transportiert werden. Am Besten wurde dieser Weg in *S. cerevisiae* charakterisiert. Um ein komplett synthetisiertes Protein über die eukaryontische rER-Membran zu translozieren, muß dieses Protein translokationskompetent gehalten werden. Damit ist gemeint, daß es keine starke Sekundärstruktur annimmt.

Die Länge der Polypeptidkette ist ein kritisches Merkmal für die SRP-unabhängige posttranslationale Translokation (Müller und Zimmermann, 1987; Rothblatt und Meyer, 1987; Schlenstedt und Zimmermann, 1987). Die meisten Proteine, die posttranslational über RM *in vitro* transloziert werden können, sind relativ kurz (weniger als 100 Aminosäuren) und nehmen vor der Translokation wahrscheinlich keine starke Sekundärstruktur an (Müller und Zimmermann, 1988). Zusätzlich können ein Ungleichgewicht in Bereichen positiver und negativer Ladungen (Müller und Zimmermann, 1987) und die Bildung von Disulfid-Brücken (Müller und Zimmermann, 1988) eine posttranslationale Translokation begünstigen.

ATP und zytosolische Faktoren könnten dafür erforderlich sein, diese Proteine in einem translokations-kompetenten Zustand zu halten. Hsp70 kann teilweise diese zytosolischen Faktoren ersetzen (Zimmermann *et al.*, 1988). Hsp70 könnte daher eine zentrale Rolle im posttranslationalen Proteintransport über die rER-Membran spielen.

Proteine können aber auch ihre posttranslationale Translokationskompetenz behalten, wenn Ribosomen an der Polypeptidkette assoziiert bleiben. Dies deutet darauf hin, daß das Ribosom und SRP das Polypeptid daran hindern, eine dicht gefaltete Konformation vor der



## Einleitung

---

Translokation einzunehmen (Sanz und Meyer, 1988). Die Bezeichnung "Ribosom-gekoppelte" Translokation unterscheidet sie von der authentischen posttranslationalen Translokation von kompletten Polypeptiden (Garcia *et al.*, 1988).

Nach der Synthese muß das Protein zielgerichtet zur ER-Membran transportiert werden. Mögliche Kandidaten für einen Rezeptor an der ER-Membran könnten das Sec63p oder Untereinheiten des Translokationskanals selbst sein (Jungnickel und Rapoport, 1995; Ogg *et al.*, 1992). Sec63p ist eine Untereinheit des hetero-oligomeren Sec63-Komplexes (Brodsky und Schekman, 1993; Panzner *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 1992), der mit dem Translokationskanal assoziiert ist. Der in der posttranslationalen Translokation verwendete Kanal ist der Sec61-Komplex.

### 1.4 N-terminale Signalsequenzen und deren Abspaltung

Die meisten N-terminalen SS werden während oder kurz nach der Translokation des entsprechenden Pre-Proteins von einer Protease abgespaltet (Blobel und Dobberstein, 1975). Im Gegensatz zu Bakterien (Dev und Ray, 1984; Ito, 1982; Watts *et al.*, 1983) werden in Säugern aber nicht alle Pre-Proteine mit gleicher Effizienz und komplett prozessiert (Jackson und Blobel, 1977). Daneben gibt es aber auch Proteine, bei denen die N-terminale SS überhaupt nicht abgespaltet wird. Solche SS werden Signal-Anker-Sequenz genannt.

Es gibt also einen nahezu fließenden Übergang von SS, die kotranslational abgespaltet werden, bis zu SS, die nicht abgespaltet werden. Die Ähnlichkeit von diesen SS erkennt man daran, daß ein normalerweise lösliches sekretorisches Protein bei Inhibition der SS-Abspaltung Membran-verankert bleibt (Dalbey und Wickner, 1985; Fikes *et al.*, 1987; Pluckthun und Pfitzinger, 1988), während auch kleinere Veränderungen innerhalb der Sequenz eine Signal-Anker-Sequenz in eine abspaltbare SS überführen können (Lipp und Dobberstein, 1986; Shaw *et al.*, 1988; Szczesna-Skorupa und Kemper, 1988).

#### 1.4.1 Signalsequenz-Abspaltung

Die Spaltungsstelle für die SS-Abspaltung wird charakterisiert durch kleine, ungeladene Aminosäuren an den Positionen -1 und -3 und  $\alpha$ -Helix-brechende Prolin- oder Glyzin-Aminosäuren (von Heijne, 1990). Die am häufigsten gefundene Sequenz innerhalb dieses -1,-3-Motivs ist die Sequenz Ala-X-Ala (von Heijne, 1986c). Die Enzyme, die bei Säugern diese Spaltung katalysieren, werden als Signalpeptidase (SPase) bezeichnet und sind integrale Membranproteine (Lively und Walsh, 1983), die für ihre Aktivität Phospholipide benötigen (Jackson und White, 1981).

SPasen sind Endopeptidasen, die anderen Serin-Proteasen ähneln (Dalbey und G., 1992). Das katalytische Zentrum befindet sich auf der luminalen Seite der ER-Membran (bzw. an der äußeren Oberfläche der bakteriellen PM) und ist umgeben von einer hydrophoben Region. An den Positionen -1 und -3 der Spaltungsstelle dürfen deshalb nur kleine ungeladene,

## Einleitung

aliphatische Aminosäuren vorhanden sein (Paetzel *et al.*, 1998; von Heijne, 1998). Die Spezifität der SPase scheint von Regionen entweder in der SS oder im reifen Protein abhängig zu sein, die sich in einiger Entfernung von der Spaltungsstelle befinden (Hurt *et al.*, 1987; Kraus *et al.*, 1988; Vassarotti *et al.*, 1987a). Außerdem scheint die Spezifität der Spaltung eher auf einem dreidimensionalen Motiv um die Spaltungsstelle als auf einer spezifischen Aminosäure-Sequenz zu beruhen (McAda und Douglas, 1982).

Der SPase-Komplex (SPC) besteht in Säugern aus wenigstens fünf Untereinheiten (Evans *et al.*, 1986). Die nicht-katalytischen Untereinheiten des eukaryontischen SPC könnten als regulatorische Untereinheiten für die SS-Erkennung dienen und sind nahe dem Translokationskanal lokalisiert (Meyer und Hartmann, 1997). Der Sec61-Komplex wechselwirkt mit einer Untereinheit des SPC (Kalies *et al.*, 1998). Obwohl die Prozessierung für die Translokation nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein scheint (Randall, 1983), könnte diese Wechselwirkung dazu dienen, den SPC zur Translokationsstelle zu rekrutieren und damit insgesamt die Translokationseffizienz der naszierenden Polypeptidkette zu erhöhen.

### 1.4.2 Nicht-abgespaltete Signalsequenzen (Signal-Anker-Sequenz)

Es gibt Proteine, bei denen die N-terminale SS nicht abgespaltet wird. Wenn eine Export-SS nicht abgespaltet wird und etwa 20 Aminosäuren lang ist, kann sie als Signal-Anker-Sequenz fungieren, die das Protein permanent über seine hydrophobe Region innerhalb der Membran verankert. Das Schlüsselmerkmal einer Signal-Anker-Sequenz scheint eher die gesamte Hydrophobizität als eine besondere Sequenz zu sein. Die flankierenden Regionen könnten aber eine wichtige Rolle bei der Orientierung in der Membran spielen (Zerial und Garoff, 1987). Wenn keine weiteren *trans*-Membran-Domänen vorhanden sind, besitzt das durch die SS verankerte Membranprotein eine Typ I- oder Typ II-Topologie. Typ I-Membranproteine exponieren den N-Terminus ihrer Signal-Anker-Sequenz auf der *trans*-Seite der Membran. Bei Typ II-Membranproteinen ist der N-Terminus dagegen dem Zytosol zugewandt. Der Mechanismus dieser Insertion in die Membran ist noch nicht bekannt.

Die Typ I-Orientierung wird durch wenige oder keine geladenen AS in der n-Region oder eine lange h-Region begünstigt. Typ II-Orientierung tritt dagegen bevorzugt bei geladenen Aminosäuren in der n-Region, der Faltung dieser Region oder einer kürzeren h-Region auf (Sakaguchi *et al.*, 1992; Sipos und von Heijne, 1993; Wahlberg und Spiess, 1997).

Fast alle Proteine, deren N-terminale sekretorische SS nicht während oder nach der Translokation abgespaltet wird, sind in der Membran verankert. Die einzigen bekannten Ausnahmen sind Ovalbumin (Meek *et al.*, 1982; Tabe *et al.*, 1984) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2 (Ye *et al.*, 1988), die trotz ungespalteter SS jeweils ein lösliches sekretiertes Protein sind.

# Einleitung

---

## 1.4.3 Besondere Eigenschaften von Signalsequenzen

SS führen eine Vielzahl von Funktionen aus. Sie können zwischen verschiedenen Wegen für den zielgerichteten Transport zu einer Membran wählen (Berks, 1996; Ng *et al.*, 1996; Weiner *et al.*, 1998). Sie vermitteln die Translokation des N- oder C-Terminus eines Pre-Proteins über die Membran (Spiess, 1995). Außerdem erlauben sie dem Pre-Protein entweder im Zytosol zu bleiben, in die Membran zu inserieren oder über die Membran zu translozieren (Belin *et al.*, 1996; Swameye und Schaller, 1997). SS können sogar nach ihrer Abspaltung vom Pre-Protein eine weitere Funktion haben (Braud *et al.*, 1998; Long, 1998; Martoglio *et al.*, 1997).

SS beeinflussen die Konformation von Polypeptiden, was sich in der Sensitivität gegenüber Proteasen, in der Amphiphilität oder in Unterschieden in der spezifischen katalytischen Aktivität widerspiegelt (Dierstein und Wickner, 1985; Roggenkamp *et al.*, 1985).

Außerdem können SS bei Kontakt mit Membranen ihre Konformation ändern (Briggs und Gierasch, 1984) und eine Umlagerung in der Packung von Phospholipiden induzieren (Batenburg *et al.*, 1988a; Batenburg *et al.*, 1988b). Der initiale Schritt für die SS-Insertion in die Ziellmembran während der Protein-Translokation könnte auf dieser Umlagerung beruhen.

### 1.4.3.1 Effizienz des zielgerichteten Transports

SS können sich in ihrer Effizienz unterscheiden, mit der sie den zielgerichteten Transport und die Membran-Insertion fördern. Ein gegebenes Protein kann trotz N-terminaler SS sowohl im Zytosol lokalisiert sein, als auch über den Sekretorischen Weg transportiert werden (Belin *et al.*, 1996). Dafür könnte entweder eine reduzierte Affinität zum Translokationskanal oder zu Faktoren verantwortlich sein, die es zielgerichtet transportieren (Hegde und Lingappa, 1997; Jungnickel und Rapoport, 1995; Voigt *et al.*, 1996).

### 1.4.3.2 Kotranslationale Signalsequenz-Abspaltung

Die meisten N-terminalen SS werden während oder kurz nach der Translokation des entsprechenden Pre-Proteins entfernt (Blobel und Dobberstein, 1975). Die Enzyme, die diese Entfernung katalysieren, werden Signalpeptidasen (SPasen) genannt. Sie sind Endoproteasen, weil sie die SS als Ganzes entfernen (Dev und Ray, 1984; Jackson und Blobel, 1977; Mollay, 1982; Zwizinski und Wickner, 1980). Die Funktion dieser Proteasen ist für die korrekte Sekretion von Proteinen und für das Überleben der Zelle in *E. coli* und *S. cerevisiae* erforderlich (Date, 1983; Verner und Schatz, 1988; Wu und Tokunaga, 1986; Yaffe und Schatz, 1984). In Hefe wurde gezeigt, daß der Sec61-Komplex mit einer Untereinheit des SPase-Komplexes wechselwirkt (Kalies *et al.*, 1998). Diese Wechselwirkung könnte für eine kotranslationale SS-Abspaltung erforderlich sein.

## Einleitung

---

Blobel und Dobberstein haben vermutet, daß die SPase so in der Membran orientiert ist, daß sich das katalytische Zentrum auf der äußeren Oberfläche der PM oder dem Lumen des ER befindet (Blobel und Dobberstein, 1975).

Aus dieser Abspaltung der SS vom Pre-Protein resultieren die in der Membran integrierte SS und das sekretorische Protein im Lumen des ER.

### 1.4.3.3 Posttranslationale Signalsequenz-Abspaltung

Die Stelle, an der die Verzögerung des Proteintransports entlang des Sekretorischen Weges am größten ist, scheint der Übergang vom ER zum Golgi-Apparat zu sein (Lodish, 1988). Nur richtig gefaltete Proteine werden vom ER in Richtung Golgi-Apparat transportiert. Die Geschwindigkeit, mit der sich ein Protein im ER faltet, hat also einen Einfluß auf die Zeit, die ein Protein im ER verbringt (Kreis und Lodish, 1986; Williams *et al.*, 1988). SS können die Faltung des reifen Teils des Polypeptids verlangsamen (Li *et al.*, 2000; Park und Randall, 1988). Die Prozessierung von SS könnte daher die Geschwindigkeit beeinflussen, mit der das sekretorische Protein entlang des Sekretorischen Weges transportiert wird (Bohni *et al.*, 1988; Kornfeld und Kornfeld, 1985; Lodish *et al.*, 1987; Silve *et al.*, 1987).

Das sekretorische Glykoprotein gp120 des HIV-1 (human immunodeficiency virus Typ I) wird über den Sekretorischen Weg zur PM transportiert, wobei der Transport aus dem ER der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dabei beeinflußt die posttranslationale SS-Abspaltung über die Wechselwirkung des Pre-Proteins mit dem Chaperon Calnexin nicht nur die Effizienz, sondern auch die Geschwindigkeit des Transports des reifen gp120 aus dem ER (Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1994).

## 1.5 Schicksal von Signalpeptidfragmenten

Abgespaltene SS werden auch Signalpeptide (SP) genannt. Das Schicksal von nur wenigen SP wurde bisher untersucht. Die meisten dieser untersuchten SP akkumulierten nicht, sondern wurden schnell abgebaut. Daher wurde angenommen, daß sie keine weitere Funktion mehr besitzen (Habener *et al.*, 1979; Hussain *et al.*, 1982; Jackson und Blobel, 1977; Ray *et al.*, 1986; Zwizinski und Wickner, 1980).

Gegen eine Akkumulation der abgespalteten SS in der Zelle sprechen mehrere Gründe. Freie SP könnten verhindern, daß sekretorische Proteine zielgerichtet zur Membran des rER bzw. der bakterielle PM transportiert werden, indem sie mit den jeweiligen Transportsystemen wechselwirken (Chen *et al.*, 1987; Koren *et al.*, 1983; Majzoub *et al.*, 1980; Wickner *et al.*, 1987). Außerdem haben SS *in vitro* einen schädlichen Einfluß auf Lipid-Mono- und Doppelschichten (Briggs *et al.*, 1985). Sie könnten daher auch einen ähnlichen Effekt auf die Membranen *in vivo* haben, wenn sie dort in großen Mengen akkumulieren würden.

## Einleitung

---

### 1.5.1 Signalpeptid-Prozessierung in *E. coli*

Bakterielle SS können nach der Abspaltung vom Pre-Protein durch Peptidase IV (Hussain *et al.*, 1982; Pacaud, 1982), Oligopeptidase A (Vimr *et al.*, 1983) und andere lösliche oder Membran-assoziierte Peptidasen abgebaut werden (Novak, 1986). Bakterielle SP könnten aber auch weitere Funktionen haben.

Das Gram-positive Bakterium *Enterococcus faecalis* sekretiert ein Peptidpheromon (cAD1), das eine Paarungsantwort in anderen *Enterococci* induziert, welche das Plasmid pAD1 besitzen (Dunny und Leonard, 1997). Das Pheromon besteht aus den acht C-terminalen Aminosäuren der SS eines Pre-Proteins, das in die PM als Typ II-Membranprotein inseriert wird (An *et al.*, 1999; Firth *et al.*, 1994). Die SS wird auf der periplasmatischen Seite der bakteriellen PM durch SPase vom Pre-Protein abgespaltet. Anschließend wird das Oktapeptid durch eine Spaltung innerhalb der PM ins Periplasma freigesetzt.

### 1.5.2 Signalpeptid-Prozessierung in Eukaryonten

Es wird angenommen, daß eine sogenannte Signalpeptidpeptidase (SPPase) die abgespalteten SS in Eukaryonten prozessiert. Diese SPPase konnte bisher nicht identifiziert werden.

Es wurde aber eine neue Klasse von Metalloproteasen gefunden, die eine sogenannte *intra*-Membran-Proteolyse katalysieren (Rudner *et al.*, 1999). Diese Proteasen spalten ihre Substrat-Proteine innerhalb Membranregionen und fördern die Entlassung von Proteindomänen aus der Membran. Dieser Mechanismus wird allgemein als Rip (regulated intramembrane proteolysis) bezeichnet (Brown *et al.*, 2000).

In allen bisher bekannten Fällen der Rip findet keine Spaltung innerhalb der Membran-durchspannenden Aminosäure-Sequenz statt, wenn nicht zuvor der größte Teil des Proteins auf der extrazytosolischen Seite durch eine primäre Spaltung entfernt wurde, wodurch das extrazytosolische Segment kürzer als 30 Aminosäuren wird (Annaert und De Strooper, 1999; Brou *et al.*, 2000; Brown und Goldstein, 1999; Chan und Jan, 1999; Mumm *et al.*, 2000). Dies trifft auf abgespaltete SS zu.

Membran-inserierte SP könnten daher durch einen ähnlichen Typ von Proteasen prozessiert werden, der diese Peptide innerhalb der *trans*-Membran-Region spaltet und die Entlassung von Peptidfragmenten aus den Membranen erleichtert (Weihofen *et al.*, 2000).

### 1.5.3 Funktionen von Signalpeptidfragmenten

Das sekretorische Proteinhormon Pre-Prolaktin (pPL) besitzt eine 30 Aminosäuren lange N-terminale SS, die kotranslational während der Translokation des Proteins über die ER-Membran abgespaltet wird. In einem synchronisierten *in vitro* System konnte gezeigt werden, daß das SP in der Membran weiter prozessiert wird. Ein N-terminales Signalpeptidfragment

## Einleitung

---

(SPF) resultiert aus dieser Prozessierung und wird in das Zytosol entlassen (Lyko *et al.*, 1995).

Es ist bisher nicht klar, ob dieser Prozeß reguliert wird (Klappa *et al.*, 1996; Schreiber und Crabtree, 1992). Das ins Zytosol entlassene SPF von pPL wechselwirkt effizient mit dem regulatorischen Protein Calmodulin (CaM) (Martoglio und Dobberstein, 1996). An CaM binden Proteindomänen, die eine basische amphipatische  $\alpha$ (baa)-Helix besitzen (O'Neil und DeGrado, 1990). Die pPL-SS besitzt eine verlängerte basische n-Region, die potentiell eine solche  $\alpha$ (baa)-Helix bilden kann. Dasselbe gilt für die SS des HIV-1 Hüllproteins gp160. Ein N-terminales SPF dieser SS bindet ebenfalls an CaM. Es wurde postuliert, daß die Signalpeptidfragmente von bestimmten SP als regulatorische Peptide wirken könnten (Martoglio *et al.*, 1997).

### 1.5.4 Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch MHC I-Moleküle

Ein Teil des Immunsystems von Wirbeltieren ist darauf spezialisiert, Zellen zu erkennen, die zellfremde oder mutierte Proteine synthetisieren (z. B. Pathogen-infizierte Zellen, Tumorzellen). Diese Proteine müssen zunächst in Peptide gespaltet werden. Die Peptide können anschließend durch MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche als Molekülkomplexe präsentiert werden (Morrison *et al.*, 1986). Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen diejenigen Molekülkomplexe, deren Peptid von einem zellfremden oder mutierten Protein stammt und leiten die Lyse der entsprechenden Zellen ein.

Die MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt, die sich dadurch unterscheiden, daß sie Peptide von endogenen (MHC I) oder exogenen Proteinen (MHC II) binden. MHC I-Moleküle werden in der Regel auf der Zelloberfläche aller zellkernhaltigen Zellen exprimiert. Um an MHC I-Moleküle binden zu können, müssen Proteine zu Peptiden einer bestimmten Länge prozessiert werden. Die meisten Peptide, die durch MHC I-Moleküle auf der PM präsentiert werden (Germain, 1994; Rammensee *et al.*, 1993), stammen von intrazellulär synthetisierten Proteinen ab, die hauptsächlich durch Proteasomen im Zytosol abgebaut werden (Pamer und Cresswell, 1998; Rock und Goldberg, 1999). Die Bindung der entstandenen Peptide an MHC I-Moleküle erfolgt hingegen im ER und vielleicht im *cis*-Golgi-Kompartiment. Die meisten durch MHC I-Moleküle präsentierten Peptide werden zunächst durch den Peptid-Transporter TAP (transporter associated with antigen processing) vom Zytosol in das ER-Lumen transportiert (Kleijmeer *et al.*, 1992; Momburg und Hammerling, 1998). Der Komplex aus Peptid und MHC I-Molekül gelangt anschließend über einen strikt geregelten Mechanismus entlang des Sekretorischen Weges zur PM (Pamer und Cresswell, 1998). CTL erkennen mit spezifischen Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche Komplexe aus MHC I-Molekülen und daran gebundene Peptide. Eine Zelle, die ein MHC I-Molekül auf der Zelloberfläche besitzt, das ein zellfremdes oder mutiertes Peptid präsentiert, löst die durch CTL gesteuerte Lyse dieser Zelle aus.

## Einleitung

---

Aufgrund ihrer Eigenschaften wird zwischen klassischen und nicht-klassischen MHC I-Molekülen unterschieden. Klassische MHC I-Moleküle zeichnen sich durch einen hohen Polymorphismus aus. Nicht-klassische MHC I-Moleküle sind zwar homolog zu den klassischen MHC I-Molekülen, werden aber durch einen limitierten Polymorphismus und eine geringe Zelloberflächen-Expression charakterisiert (Shawar *et al.*, 1994). Die Peptidbindung erfolgt bei beiden Molekülklassen wahrscheinlich auf die gleiche Weise.

### 1.5.4.1 Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch klassische MHC I-Moleküle

Klassische MHC I-Moleküle präsentieren aufgrund ihres Polymorphismus eine riesige Anzahl von Peptiden, die von nahezu allen in der Zelle synthetisierten Proteinen stammen. Dies schließt virale Proteine ein, die von infizierten Zellen synthetisiert werden. Unter anderem werden auch Signalpeptidfragmente von einigen sekretorischen oder Typ I-Membranproteinen im Komplex mit klassischen MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Einige von diesen Signalpeptidfragmenten, die hauptsächlich den C-terminalen Segmenten der SP entsprechen, werden unabhängig vom TAP auf MHC I-Moleküle geladen (Henderson *et al.*, 1992; Wei und Cresswell, 1992). Für ein Epitop, das von der n-Region der vermuteten SS des LCMV Glykoproteins GP-C abstammt, wurde hingegen von einer strikt TAP-abhängigen Bindung an MHC I-Molekülen berichtet (Hombach *et al.*, 1995). Außerdem scheint die Präsentation dieses Epitops abhängig von Proteasomen zu sein (Gallimore *et al.*, 1998).

Diese Resultate sprechen dafür, daß Signalpeptidfragmente von der Membran ins ER-Lumen oder ins Zytosol entlassen werden können.

### 1.5.4.2 Präsentation von Signalpeptidfragmenten durch nicht-klassische MHC I-Moleküle

Die nicht-klassischen MHC I-Moleküle H2-M3 von Mäusen haben eine hohe Affinität für Peptide, die ein N-formyliertes Methionin als erste Aminosäure besitzen (Shawar *et al.*, 1990; Shawar *et al.*, 1993). In Prokaryonten ist in jedem Protein das initiale Methionin und damit auch das N-terminale Methionin von SP formyliert. In Eukaryonten besitzen lediglich die in Mitochondrien und Chloroplasten synthetisierten Proteine N-Formyl-Methionine. Daher präsentieren H2-M3-Moleküle präferentiell Antigene, die von intrazellulären Bakterien stammen (Shawar *et al.*, 1991). Proteine von intrazellulären Pathogenen, die ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert werden, können wie zytosolische Wirtsproteine prozessiert und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Brunt *et al.*, 1990). Ein durch H2-M3 präsentiertes N-formyliertes Peptid vom intrazellulären Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* wurde als Teil eines SP identifiziert (Princiotta *et al.*, 1998).

Signalpeptidfragmente zeigen dem Immunsystem die Expression von MHC I-Molekülen an. Signalpeptidfragmente von klassischen MHC I-Molekülen können nämlich an das nicht-klassische MHC I-Molekül HLA-E binden und werden auf der Zelloberfläche den

## Einleitung

---

Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) präsentiert (Brooks *et al.*, 1999). Diese NK-Zellen erkennen den HLA-E/Peptid-Komplex, werden dadurch inhibiert und können die entsprechende Zelle nicht zerstören (Borrego *et al.*, 1998; Braud *et al.*, 1998). Wenn die Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche aber aufgrund einer Virusinfektion verhindert wird, lysieren die NK-Zellen diese infizierten Zellen (Wiertz *et al.*, 1996). Durch eine solche Regulation wird verhindert, daß infizierte Zellen, die keine MHC I-Moleküle exprimieren und daher keine Peptide präsentieren können, der Kontrolle des Immunsystems entgehen.

### 1.6 Ziel dieser Arbeit

Für einige Signalsequenzen ist eine weitere Funktion nach der Abspaltung vom Pre-Protein vorgeschlagen worden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob SS generell eine weitere Funktion neben der Vermittlung des zielgerichteten Transportes und der Translokation über die Membran besitzen können. Daher wurde die Abspaltung und das Schicksal der vermuteten SS des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV)-Glykoproteins GP-C untersucht.

#### 1.6.1 Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus (LCMV)

Das LCM-Virus besitzt ein Genom aus RNS und ist von einer Membran-Hülle umgeben. Es ist das prototypische Mitglied der Arenaviridae. Ein Nukleokapsid-Protein (NP, 63 kDa) und zwei Glykoproteine GP-1 (44 kDa) und GP-2 (35 kDa) sind die hauptsächlichen Struktur-Proteine. Zusätzlich gibt es mindestens zwei quantitativ nebensächliche Proteine (Buchmeier und Parekh, 1987; Salvato und Shimomaye, 1989). Die Glykoproteine GP-1 und GP-2 entstehen aus der posttranslationalen Spaltung eines Vorläufer-Glykoproteins (70 bis 75 kDa) (Buchmeier und Oldstone, 1979). Sie sind die strukturellen Komponenten der Dornen auf der Virus-Oberfläche (Buchmeier *et al.*, 1978; Vezza *et al.*, 1977) und die Hauptziele der Immunantwort des infizierten Wirtes.

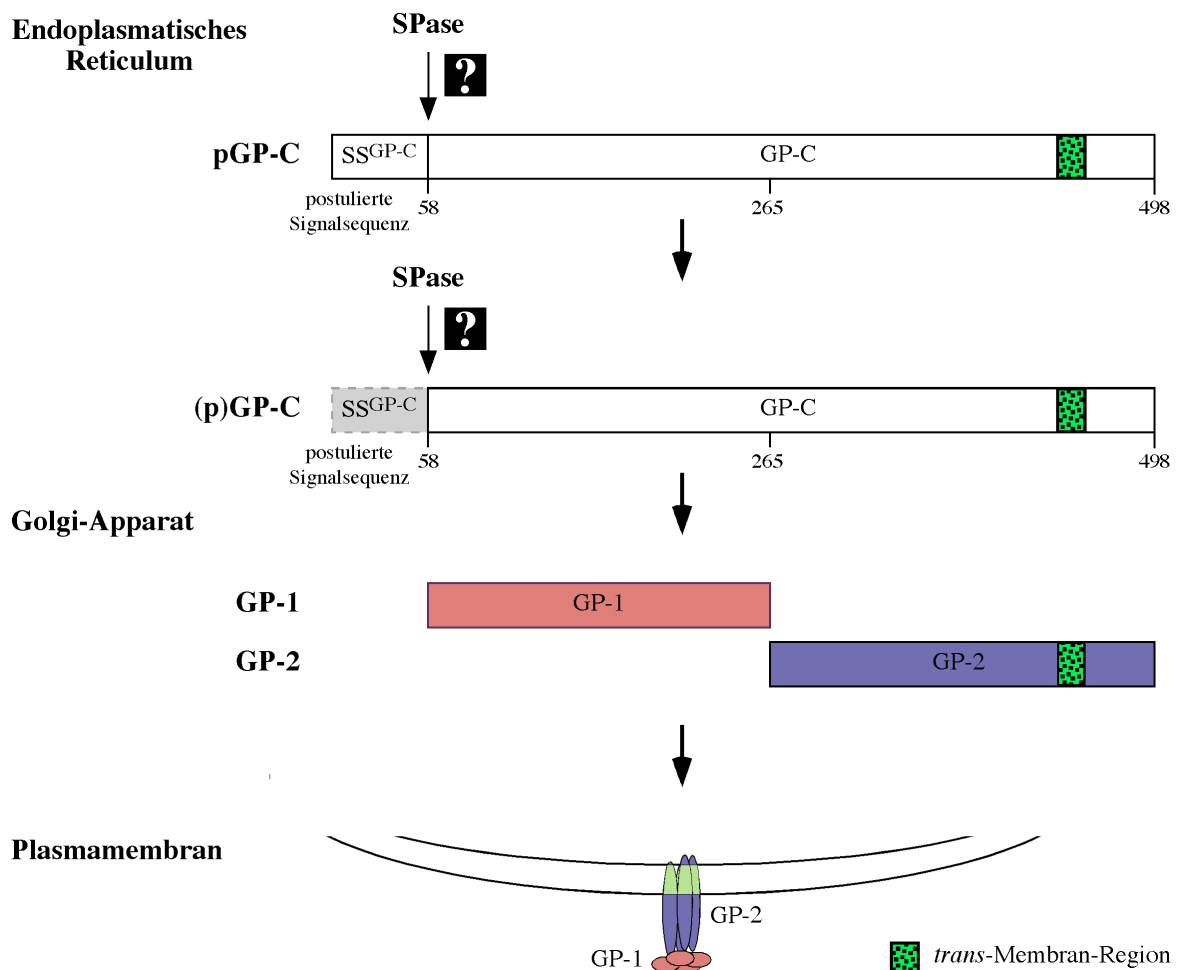
##### 1.6.1.1 Intrazellulärer Transport des LCMV-Glykoproteins

Das LCMV-Glykoprotein wird bei einer akuten Infektion von zellulären Ribosomen als Vorstufe pGP-C synthetisiert, über die ER-Membran transloziert und siebenfach N-glykosyliert (Wright *et al.*, 1990). Dabei ist die N-Glykosylierung und die daran anschließende Prozessierung der Oligosaccharide für den Transport und die spätere Spaltung des Glykoproteins in GP-1 und GP-2 notwendig. 75 bis 90 Minuten nach der Synthese des pGP-C erfolgt die Spaltung wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren Alanin<sup>265</sup> und Glyzin<sup>266</sup> im medialen Golgi-Kompartiment oder dem TGN durch eine Golgi-assoziierte Furin-ähnliche Protease (Buchmeier *et al.*, 1987; Harnish *et al.*, 1981; Wright *et al.*, 1990).



## Einleitung

Das homotetramere GP-1 wird auf der PM durch ein homotetrameres GP-2 über dessen C-terminale *trans*-Membran-Domäne verankert (Burns und Buchmeier, 1991). Die beiden Tetrameren sind über ionische Wechselwirkungen miteinander verbunden (Abb. 3).



**Abb. 3** Prozessierung des Glykoproteins und Verankerung von GP-1 und GP-2 in der Plasmamembran

### 1.6.1.2 Signalsequenz des pGP-C

Gemäß dem Ergebnis eines Algorithmus', der für die Vorhersage von N-terminalen SS benutzt wird, könnte das pGP-C eine N-terminale SS besitzen (von Heijne, 1988). Bei der Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren des GP-1 wurde festgestellt, daß dieses Protein mit der Aminosäure 59 des unprozessierten pGP-C beginnt (Burns und Buchmeier, 1991). Aufgrund dieser beiden Ergebnisse wurde postuliert, daß es sich bei den Aminosäuren 1 bis 58 des pGP-C um eine N-terminale SS handelt, die im ER abgespaltet wird.

Bisher wurde die Abspaltung dieser SS aber noch nicht experimentell bestätigt. Außerdem ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt, in welchem Kompartiment und durch welchen Mechanismus diese 58 Aminosäuren entfernt werden.

## Einleitung

---

### 1.6.1.3 CTL-Epitop innerhalb der Signalsequenz

Innerhalb der postulierten SS des pGP-C wurde das immunodominante CTL-Epitop des pGP-C lokalisiert. Es umfaßt die Aminosäuren 33 bzw. 34 bis 43 des unprozessierten pGP-C und war damit das erste CTL-Epitop, das in einer SS gefunden wurde (Hudrisier *et al.*, 1997; Klavinskis *et al.*, 1990; Pircher *et al.*, 1990). Diejenige Zelle, die dieses Epitop auf der Zelloberfläche präsentiert, kann CTL-vermittelt lysiert werden. Außerdem ist es das einzige CTL-Epitop des LCMV, das einen Schutz vor einer letalen Virusinfektion induzieren kann (Klavinskis *et al.*, 1990).

Dieses CTL-Epitop wird von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Präsentation zeigt eine Abhängigkeit von der Aktivität des Proteasoms (Gallimore *et al.*, 1998). Außerdem ist die Präsentation des Epitops nach Virusinfektion strikt abhängig von einem funktionellen TAP-Heterodimer (Hombach *et al.*, 1995).

### 1.6.2 Experimenteller Ansatz

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Abspaltung und des Schicksals der Signalsequenz des LCMV-Glykoproteins in einem zellfreien *in vitro* Translations-/Translokationssystem. Mit diesem System ist es möglich, nicht nur die Translation von Proteinen, sondern auch die Translokation dieser Proteine über bzw. die Insertion in die Membran von Rauhen Mikrosomen (RM) zu untersuchen. Nach der Herstellung von Translokationsintermediaten kann unter definierten Bedingungen die Abspaltung der SS synchronisiert und charakterisiert werden. Zusätzlich kann die Prozessierung der abgespalteten SS untersucht werden. Für die Detektion und Isolierung der abgespalteten SS, des reifen Proteins und des Pre-Proteins sollten verschiedene Peptide synthetisiert und gegen diese anti-Peptid-Antikörper hergestellt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der SS-Abspaltung *in vivo*. Dazu sollten kultivierte Zellen sowohl transient transfiziert als auch mit dem LCM-Virus infiziert und anschließend mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein radioaktiv markiert werden. Die Prozessierung des radioaktiv markierten Glykoproteins sollte dann analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkultur

##### 2.1.1.1 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung der Zelllinie</u>
HeLa	humane Cervix-Karzinom-Zellen
Vero	afrikanischer Grün-Affe Nierenzellen
293T	humane Nierenzellen

##### 2.1.1.2 Material für die Zellkultur

DMEM, FCS, Glutamin (100fach konzentriert), Penicillin/Streptomycin (100fach konzentriert) und Trypsin-EDTA wurden von Gibco-BRL, Eggenstein erhalten.

DMSO wurde von Sigma, Deisenhof, Plastikröhrchen (15 ml, steril) von Falcon/Becton & Dickinson, Heidelberg, Zellkultur-Flaschen und -Schalen von TPP, Schweiz und Kryoröhrchen (1 ml, steril) und Zellenkratzer von Nunc, Wiesbaden erhalten.

#### 2.1.2 Bakterien

Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  wurde für alle Klonierungen verwendet und von Gibco BRL, Eggenstein erhalten.

#### 2.1.3 Reagenzien

##### 2.1.3.1 Chemikalien

Das Akzeptortripeptid N-Benzoyl-Asn-Leu-Thr-Methylamid wurde von der Peptid-Synthese im ZMBH, Heidelberg synthetisiert.

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen erhalten:

Ambion, USA: RNasin Ribonuklease Inhibitor

## Material

---

AppliChem, Darmstadt: EDTA

Appligene: Aqua-Phenol ( $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{OH} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ )

BDH, England: SDS

Biomol, Ilvesheim: X-Gal

BioRad, München: Xylencyanol

Calbiochem, Bad Soden: KLH, NP-40

Fluka, Neu-Ulm: Ethanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), Milchpulver, Nikkol, TEMED

Gibco BRL, Eggenstein: HEPES

Merck, Darmstadt: 6-Aminohexansäure ( $\text{NH}_2\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$ ), Ammoniumazetat ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ), Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Azeton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), DTT, Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Ethanthiol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ ), Formaldehyd ( $\text{H}_2\text{CO}$ ), Glyzerin, Glyzin, Isoamylalkohol, Kaliumazetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ), Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ ), Kaliumhexacyanoferrat (II) ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), Kaliumhexacyanoferrat (III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), Kaliumhydroxid ( $\text{KOH}$ ), Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ), Magnesiumazetat-Tetrahydrat ( $\text{Mg}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Natriumazetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ), Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), Paraffin, 2-Propanol ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ), Salzsäure (37%ig;  $\text{HCl}_{\text{aq}}$ ), TCA ( $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

National Diagnostics, USA: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

NEB, Schwalbach: BSA, CAP-Analogen

Packard, Niederlande: Szintillationslösung

Pharmacia/Biotech, Freiburg: „NHS-activated Sepharose 4 fast flow“

Pierce, USA: Sulfo-SMCC

Promega, Heidelberg: Aminosäuremischung (ohne Cystein/Methionin bzw. ohne Methionin)

Roche, Mannheim: ATP, CTP, desoxyATP, desoxyCTP, desoxyGTP, desoxyTTP, GTP, Kreatinphosphat, UTP

Sigma, Deisenhof: Ammoniumperoxodisulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), Ampicillin, DMF ( $(\text{CH}_3)_2\text{NCHO}$ ), DMSO ( $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ), Freund's Adjuvant (komplett, nicht komplett), Glukose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), 7-Methyl-GMP, Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ), PMSF ( $(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{CH}_3)\text{SO}_3\text{F}$ ), Ponceau S, Puromycin, Saccharose, Saponin, Spermidin, Tris, Triton X-100, Trizin, Tween-20, Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ )

### 2.1.3.2 Radiochemikalien

Die Radiochemikalien [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin, [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein, [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Proteinstandard (hohe Molekulargewichte), [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Proteinstandard (niedrige Molekulargewichte) wurden von der Firma Amersham, Braunschweig erhalten.

## Material

---

### 2.1.4 Standardlösungen und Puffer

<u>Standardlösung/Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Ampicillin	25 g/l (in H <sub>2</sub> O)
CLAP-Mischung (1000fach)	10 g/l Aprotinin, 10 g/l Chymostatin, 10 g/l Leupeptin, 10 g/l Pepstatin
PBS	137 mM NaCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 2.1.5 Enzyme

Die Restriktionsenzyme Bam HI, Dra III, Eco RV, Nco I und die Enzyme Endo H, PNGase F, T4-DNA-Ligase wurden von der Firma NEB, Schwalbach erhalten. Von der Firma Roche, Mannheim wurde das Restriktionsenzym Xho I und die Enzyme CIP, Taq-Polymerase, Kreatinkinase bezogen. Das Enzym Proteinase K wurde von Merck, Darmstadt erhalten. Die SP6-Polymerase wurde von K. Meese isoliert und zur Verfügung gestellt. Das Enzym Pfu-Polymerase wurde von Stratagene, USA und Trypsin von Sigma, Deisenhof erhalten.

### 2.1.6 Proteinstandards

Die Proteinstandards mit den Molekulargewichtsbereich 14 bis 17 und 30 bis 200 kDa wurde von Sigma, Deisenhof bezogen. Die vorgefärbten Proteinstandards mit geringem Molekulargewicht und breitem Molekulargewichtsbereich wurden von BioRad, München erhalten.

### 2.1.7 Nukleinsäuren und Plasmide

#### 2.1.7.1 DNS-Standards

Der DNS-Standard 100 bp wurde von NEB, Schwalbach und der DNS-Standard 1 kb von Gibco-BRL, Eggenstein erhalten.

## Material

### 2.1.7.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')
SP6a	CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG
T7b	CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G
*SS1a	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -CAT GGG CCA GAT CGT GAC CAT GTT CGA GGC CCT GCC CCA CAT CAT CGA CGA GGT GAT CAA CAT CGT GAT CAT CGT GCT G
*SS1b	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -GAT GAT CAC GAT GTT GAT CAC CTC GTC GAT GAT GTG GGG CAG GGC CTC GAA CAT GGT CAC GAT CTG GCC
*SS2a	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -ATC ATC ATC ACC AGC ATC AAG GCC GTG TAC AAC TTC GCC ACC TGC GGC ATC CTG GCC CTG GTG AGC TTC CTG TTT CTG GCC
*SS2b	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -GGC CGG CCA GAA ACA GGA AGC TCA CCA GGC CCA GGA TGC CGC AGG TGG CGA AGT TGT ACA CGG CCT TGA TGC TGG TGA TGA TGA TCA GCA C
*SS3a	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -GGC CGC AGC TGC GGC ATG TAC GGC CTG AAC GGC CCC GAT ATC TAT AAA GGG
*SS3b	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -GAT CCC CTT TAT AGA TAT CGG GGC CGT TCA GGC CGT ACA TGC CGC AGC TGC
*SS <sup>N</sup> b	ATG TGG GCT TAG CTA GAT GCT GGT GAT GAT GAT C
*SS <sup>CTL</sup> b	GAA TGT GGG CTT AGC AGG TGG CGA AGT TGT AC
*SS <sup>GP-C</sup> b	GAA TGT GGG CTT AGC CGC AGC TGC GGC CGG C
GP-C/pPLa	GGC CGG CCG CAG CTG CGG TAC CCC CGT CTG TCC CAA TG
pSVa	GGA TCT CTA GAG TCG ACC CC
pSVb	GTC CAA ACT CAT CAA TGT ATC TTA TCA TG
HA <sub>b</sub>	CTG GAT CCT CAA GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAG CGT CTT TTC CAG ATA G
HA2a	CTA AGA GAT CTA TAC CCA TAC GAT GTT CCA G
HA3a	CAA AGT TTC TCA CTC GCA GGT ACC CAT ACG ATG TTC CAG
HA4a	GCA AGA CCA CTT GGT GCT ACC CAT ACG ATG TTC CAG
HA5a	GTC TCG AGT TAC CCA TAC GAT GTT CCA G
PL-HA <sub>a</sub>	ATC TAC AAC AAC AAC TGC TAC CCA TAC GAT GTT CC
PL-HA <sub>b</sub>	GGT AGG TCC TGT GGC ACC CCC GTC TGT CCC AAT GG

Die Oligonukleotide wurden entweder im ZMBH oder von MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

## Material

### 2.1.7.3 Plasmide

<u>erhaltenes Plasmid</u>	<u>Verwendung des Plasmids</u>	<u>erhalten/hergestellt von</u>
pSV511	Expressionsvektor (SV40-Promotor)	Keith Stanley, Ute Haman
pSV511/lip33	lip33	K. Meese
pSV511/ $\beta$ -Galaktosidase	$\beta$ -Galaktosidase	K. Meese
pGEM3Z	Klonierungsvektor	Promega, Heidelberg
pGEM3Z/pPL	Plasmid mit cDNS von pPL	K. Meese
pGEM4Z	Klonierungsvektor	Promega, Heidelberg
pGEM4Z/pGP-C	Plasmid mit cDNS von pGP-C	B. Martoglio
pTOPO	Klonierungsvektor	Invitrogen, USA
pGP-C	Plasmid mit cDNS von GP-C	Labor Zinkernagel, Zürich

Die Plasmide pSV511/pGP-C, pSV511/pGP-C-HA, pSV511/pGP-C<sub>362</sub>-HA, pSV511/pGP-1-HA, pSV511/pGP-C<sub>219</sub>-HA, pSV511/pGP-C<sub>142</sub>-HA, pSV511/pSS<sup>GPC</sup>-PL-HA, pGEM3Z/pGP-C, pTOPO/pGP-C<sub>142</sub>-HA, pTOPO/\*SS<sup>GPC</sup>, pTOPO/\*pGP-C, pTOPO/\*SS<sup>GPC</sup>-PL, wurden in dieser Arbeit hergestellt. Sie enthalten die cDNS für die angegebenen Proteine.

### 2.1.8 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>mono-/polyklonal</u>	<u>Epitop</u>	<u>hergestellt durch</u>
anti-SRP54-Ak	polyklonal	CADTFRAGAFDQL KQN (AS 136 - 152)	Stefanie Hauser
anti-Sec61 $\beta$ -Ak	polyklonal	PGTPSGTNC	Stefanie Hauser
anti-GP-C-Ak (KL25)	monoklonal		Labor Lehmann
anti-PL-Ak	polyklonal	NEFDKRYAQQILG FC (AS 68 - 80)	Bruno Martoglio
anti-HA-Ak	polyklonal	YPYDVPDYA	Santa Cruz, USA
anti-Ii-Ak	polyklonal	MPDQRDLISNNEQ LPMLGRRPGAPES K	K. Meese
anti-SS <sub>7</sub> -Ak	polyklonal	KMFEALPHIIDEVK	Marc Fröschke
anti-SS <sub>30</sub> -Ak	polyklonal	TSIKAVYNFATC	Marc Fröschke
anti-SS <sub>48</sub> -Ak	polyklonal	SFLFLAGRSC	Marc Fröschke
anti-GP-C <sub>103</sub> -Ak	polyklonal	KMGSSGLEPTFTK	Marc Fröschke
sekundärer Ak (Peroxidase- gekoppelt)			Gibco, Life Technologies, Eggenstein

### 2.1.9 Peptide

Die Sequenzen der verwendeten Peptid-Amide vom N- zum C-Terminus lauten KMFEALPHIIDEVK (SS<sub>7</sub>), TSIKAVYNFATC (SS<sub>30</sub>), SFLFLAGRSC (SS<sub>48</sub>) und KMGSSGLEPTFTK (GP-C<sub>103</sub>). Sie wurden im ZMBH synthetisiert.

### 2.1.10 Rechner-Programme

Radioaktive Protein-Gele wurden durch Fluorographie unter Verwendung eines Fujix BAS1000 Phosphoimager (Fuji, Japan) und dem Programm MacBas2.0 analysiert und die Signale quantifiziert. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit den Programmen Canvas™ 7.0.1 und Photoshop 5.0® durchgeführt. Die Balkendiagramme wurden mit dem Programm MicrosoftExcel98 hergestellt und die Arbeit mit MicrosoftWord98 geschrieben. Mit dem Programm Lasergene Navigator wurden alle Plasmid-Karten erstellt und Sequenzvergleiche von DNS- und Protein-Sequenzen durchgeführt. Das Programm ProtPredII diente der Vorhersage der Topologien von Membranproteinen. AnalyzeSignalase2.03 wurde für die Vorhersage von Spaltungsstellen der Signalpeptidase in Proteinen verwendet. Alle aufgeführten Programme wurden in einem MacIntosh-Rechner verwendet.

### 2.1.11 Geräte

Optische Dichten von Lösungen oder Suspensionen wurden mit einem LKB Ultrospec II Photometer von Pharmacia, Freiburg gemessen. Inkubationen von Eppendorf-Gefäßen wurden in Thermomixer comfort von Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

Zur Homogenisierung von Bauchspeicheldrüsen wurde ein Potter-Homogenisator von B. Braun Laborgeräte benutzt. Als Zentrifugen wurden Sorval RC5B und RC5C, Beckman Ultrazentrifuge L8-M und Ultratishzentrifuge TL-100, Eppendorf Centrifuge 5415C und 5417C und Heraeus Biofuge 15 und Megafuge 1.0R eingesetzt. Es wurden SS34 und GSA-Rotoren (Sorval) für Zentrifugationen und für Ultrazentrifugationen 45TI, 70TI und TLA100, TLA100.2 (Beckman) verwendet. Elektrotransfergerät (Semi-Dry-Blotter), Filterpapier und Einwegfilter (0,45 µm und 0,2 µm) wurden von Schleicher und Schuell, Dassel bezogen.

### 2.1.12 Sonstiges

ECL-Lösungen wurden von Amersham, Braunschweig, Kaninchen Retikulozytenlysat (Standard, Flexi™, TNT®) von Promega, Heidelberg, Nucleobond Plasmidisolierungssäulen von Macherey-Nagel, Düren, der Quick change site-directed mutagenesis kit von Stratagene, USA und Weizenkeime von General Mills, Palo Alto, CA, USA erhalten.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung der verwendeten Konstrukte

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Einzelne Abschnitte einer vorliegenden DNS können mittels PCR vermehrt werden (Saiki *et al.*, 1988). Dazu werden zwei synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 20 bis 24 Basen verwendet, die an der vorliegenden DNS hybridisieren. Die DNS-Vermehrung erfolgt durch eine zyklische Abfolge von DNS-Denaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung und DNS-Synthese, wobei die Synthese durch eine hitzetolerante DNS-Polymerase katalysiert wird. Für eine hohe Genauigkeit der DNS-Synthese wird die Pfu-Polymerase verwendet. Die Vermehrung erfolgt in einem programmierbaren PCR-Heizblock. Nach einer DNS-Denaturierung bei 95°C (5 Minuten) werden 25 aus folgenden Schritten bestehende Reaktionszyklen gestartet:

- DNS-Denaturierung (95°C, 30 Sekunden)
- Oligonukleotid-Hybridisierung (variable Temperatur, 60 Sekunden)
- DNS-Synthese (68°C, variable Zeit)

Nach dem letzten Zyklus werden für die vollständige Beendigung der DNS-Synthese 5 Minuten bei 68°C inkubiert und die Reaktion anschließend auf 4°C abgekühlt.

Oligonukleotide	Hybridisierung	DNS-Synthese	vorliegende DNS	PCR-Produkt
SP6a, 142-HA	50°C	80 Sekunden	pGEM3Z/pGP-C	SP6-142-HA
SP6a, *SS <sup>GP-C</sup> b	50°C	30 Sekunden	pGEM3Z/*pGP-C	*SS <sup>GP-C</sup>
GP-C/pPLa, T7	50°C	120 Sekunden	pGEM3Z/pPL	PL-HA1
SP6, PL-HA1	50°C	40 Sekunden	pGEM3Z/*pGP-C	*SS <sup>GP-C</sup> -PL
pSVa, HAb	60°C	180 Sekunden	pSV511/pGP-C	pGP-C-HA
HA2a, pSVb	55°C	30 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	362-HA
HA3a, pSVb	55°C	30 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	263-HA
HA4a, pSVb	55°C	30 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	219-HA
HA5a, pSVb	55°C	30 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	142-HA
pSVa, 362-HA	60°C	150 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	pGP-C362-HA
pSVa, 263-HA	60°C	120 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	pGP-1-HA
pSVa, 219-HA	60°C	110 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	pGP-C219-HA
pSVa, 142-HA	60°C	80 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	pGP-C142-HA
PL-HAa, pSVb	45°C	30 Sekunden	pSV511/pGP-C-HA	PL-HA
PL-HAb, PL-HA	60°C	120 Sekunden	pGEM3Z/pPL	PL-HA2
pSVa, PL-HA2	50°C	40 Sekunden	pSV511/pGP-C	SS <sup>GP-C</sup> -PL-HA

## Methoden

### 2.2.1.2 TOPO-Klonierung

Das TOPO-Klonierungssystem wurde entwickelt, um auf einfache Weise PCR-Produkte in einen Vektor zu inserieren. Dabei wird das PCR-Produkt direkt durch die kovalent am TOPO-Vektor gebundene DNS-Ligase in diesen ligiert. Über das durch eine erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes in den Vektor unterbrochene  $\beta$ -Galaktosidase-Gen können die Bakterienkolonien, die das Plasmid mit dem inserierten PCR-Produkt enthalten, durch ihre weiße Färbung auf X-Gal-LBA-Agarplatten identifiziert werden.

In einer 50  $\mu$ l-PCR-Reaktion werden 10 bis 100 ng DNS, je 50 pmol der zwei Oligonukleotide, je 6,25 nmol der vier dNTP, 5  $\mu$ l 10fach Polymerase-Puffer, 1,25 U Pfu-, 0,5 U Tac-Polymerase und eine entsprechende Menge H<sub>2</sub>O zusammen gegeben. Nach der Reaktion wird das PCR-Produkt über ein Agarose-Gel aufgetrennt (Maniatis *et al.*, 1982), daraus isoliert und in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. 1  $\mu$ l des isolierten PCR-Produktes wird mit 4  $\mu$ l Wasser und 1  $\mu$ l TOPO-Vektor gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1  $\mu$ l Stop-Lösung und Abkühlung auf 0°C erfolgt der Abbruch der Ligationsreaktion. Die Lösung wird zu den kompetenten TOPO<sub>10</sub>-Bakterien gemischt, die zuvor auf Eis aufgetaut wurden. Die Bakterien werden 30 Minuten auf Eis gelegt, anschließend 30 Sekunden bei 42°C inkubiert und dadurch transformiert. Nach kurzer Abkühlung der transformierten Bakterien auf Eis werden 250  $\mu$ l SOC-Medium zugegeben. Anschließend werden die Bakterien 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Auf einer LBA-Agarplatte werden 160  $\mu$ g X-Gal (in DMF) gleichmäßig verteilt und das DMF-Lösungsmittel bei 37°C verdunstet. Die transformierten Bakterien werden nun auf dieser LBA-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Plasmide pTOPO/\*SS<sup>GP-C</sup>, pTOPO/\*SS<sup>GP-C</sup>-PL, pTOPO/\*pGP-C und pTOPO/pGP-C<sub>142</sub>-HA wurden hergestellt, indem die PCR-Produkte \*SS<sup>GP-C</sup>, \*SS<sup>GP-C</sup>-PL, \*pGP-C und pGP-C<sub>142</sub>-HA in den TOPO-Vektor eingefügt wurden.

#### Spezifische Puffer/Lösungen:

SOC-Medium	20 mM Glukose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 2,5 mM KCl, 2% (w/v) Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt
X-Gal	20 $\mu$ g/ $\mu$ l (in DMF)

### 2.2.1.3 Herstellung von transformationskompetenten Bakterien und deren Transformation

Für die Vervielfältigung von Plasmiden müssen diese zunächst in Bakterien transformiert werden, welche zuvor transformationskompetent gemacht wurden. Wenn sich die transformierten Bakterien anschließend vermehren, synthetisieren sie auch große Mengen des Plasmids.

Zur Herstellung der transformationskompetenten Bakterien wird der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  über Nacht in 4 ml LB-Medium bei 37°C unter ständiger Bewegung und sterilen

## Methoden

Bedingungen wachsen gelassen. 400 µl dieser Bakteriensuspension werden zu 400 ml LB-Medium gegeben und die Bakterien unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600}$  0,4 bis 0,5 inkubiert. Alle folgenden Arbeiten werden bei 4°C bzw. auf Eis ausgeführt. Die Bakterien-Suspension wird zentrifugiert (4°C, 2.100\*g, 10 Minuten), der Überstand verworfen und die Bakterien in 80 ml eiskalter „CaCl<sub>2</sub>“-Lösung resuspendiert. Die Zentrifugation der Suspension und Resuspendierung der Bakterien in weiteren 80 ml eiskalter „CaCl<sub>2</sub>“-Lösung wird ein weiteres Mal durchgeführt und die resuspendierten Bakterien 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation (4°C, 2.100\*g, 5 Minuten) werden die Bakterien in weiteren 16 ml eiskalter „CaCl<sub>2</sub>“-Lösung resuspendiert und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wird die Bakterien-Suspension in kleinen Teilmengen von 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation werden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und maximal ein Volumen von 20 µl einer Lösung dazu gemischt, die das zu vervielfältigende Plasmid enthält. Diese Bakterien-Suspension wird erst 30 Minuten auf Eis und anschließend 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, weitere 30 Minuten auf Eis stehen gelassen, 900 µl LB-Medium dazu gegeben und 60 Minuten bei 37°C bewegt. Nach Zentrifugation (RT, 3.800\*g, 2 Minuten) werden 900 µl des Mediums verworfen, die Bakterien in den restlichen 100 µl resuspendiert, auf einer LBA-Agarplatte gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wird überprüft, welche der entstandenen Bakterienkolonien das gewünschte Plasmid enthält und diese Bakterien in LBA-Medium weiter vermehrt. Das Plasmid wird anschließend unter Verwendung von Nucleobond-Chromatographie-Säulen nach Angaben des Herstellers aus den Bakterien isoliert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

„CaCl <sub>2</sub> “-Lösung (pH 7,0)	100 mM CaCl <sub>2</sub> , 15% (w/v) Glycerin
LB-Medium (pH 7,0)	1% (w/v) Bacto Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt
LBA-Medium (pH 7,0)	1% (w/v) Bacto Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin

#### 2.2.1.4 Änderung der Basentriplets

Da eine gegebene Aminosäure meist durch verschiedene Basentriplets kodiert wird, ist es möglich, in einer bestimmten Basensequenz einzelne Basen auszutauschen, ohne die darin kodierte Aminosäure-Sequenz zu ändern. Die Änderung der Basentriplets zu solchen, die in hoch exprimierten menschlichen Genen bevorzugt verwendet werden, kann eine Steigerung der Translationsrate in menschlichen Zellen hervorrufen (Haas *et al.*, 1996).

Für eine solche Änderung der Basentriplets werden Oligonukleotide von 50 bis 90 Basen Länge synthetisiert, die an ihren jeweiligen 5'-Enden phosphoryliert werden. Jeweils zwei dieser Oligonukleotide können Basenpaarungen eingehen und repräsentierten somit ein Stück

## Methoden

cDNS mit 3'- oder 5'-Überhängen von 4 bis 6 Basen. Diese cDNS-Stücke werden mit DNS-Ligase verbunden und so in einen Vektor inseriert, daß sie für eine unveränderte Aminosäure-Sequenz kodieren.

Jeweils 25 pmol der Oligonukleotide \*SS1a, \*SS1b, \*SS2a, \*SS2b, \*SS3a und \*SS3b werden in einem Volumen von insgesamt 17,1 µl gemischt, 2 µl 10fach Ligationspuffer dazu gegeben und bei 4°C über Nacht hybridisiert. Zu den entstandenen cDNS-Stücken wird 0,4 µl DNS-Ligase gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

500 ng des Plasmids pGEM3Z/pGP-C werden mit den Restriktionsenzymen Nco I und Eco RV bei 37°C geschnitten, die Plasmide der Lösung über ein Agarose-Gel aufgetrennt (Maniatis *et al.*, 1982), das mit beiden Enzymen geschnittene Plasmid (3500 bp) daraus isoliert und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. 1 µl der Lösung, in der sich das geschnittene Plasmid befindet, wird zu den 19,5 µl der Ligationslösung gegeben, welche die ligierten cDNS-Stücke enthält. Anschließend wird die resultierende Lösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wird 1 µl der Plasmidlösung mit 17,1 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10fach Ligationspuffer und 0,4 µl DNS-Ligase gemischt und ebenfalls bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden Bakterien unter Verwendung der Kontroll- bzw. Ligationslösung jeweils transformiert und auf verschiedenen LBA-Agarplatten zu einzelnen Kolonien wachsen gelassen. Auf der Kontroll-LBA-Agarplatte sollten keine und auf der Ligations-LBA-Agarplatte einige Bakterienkolonien wachsen. Aus derjenigen Bakterienkolonie der Ligations-LBA-Agarplatte, die das richtige Plasmid pGEM3Z/\*pGP-C enthält, wird dieses schließlich isoliert.

### 2.2.1.5 Gezielte Mutagenese von Plasmiden

Wenn Plasmide eine Mutation enthalten, kann in einer speziellen PCR-Reaktion unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden und des mutierten Plasmids ein nicht-mutiertes Plasmid synthetisiert werden. Nach der PCR-Reaktion wird das mutierte Plasmid, aber nicht das neu entstandene Plasmid, selektiv durch das Restriktionsenzym Dpn I abgebaut.

In einer 50 µl-PCR-Reaktion werden 10 ng mutiertes Plasmid, je 25 pmol der zwei Oligonukleotide, je 2,5 nmol der vier dNTP, 5 µl 10fach Polymerase-Puffer, 2,5 U Pfu-Polymerase und eine entsprechende Menge H<sub>2</sub>O zusammen gegeben. Nach 12 bis 18 PCR-Reaktionszyklen werden 10 U Dpn I zugegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das PCR-Produkt wird anschließend über ein Agarose-Gel aufgetrennt (Maniatis *et al.*, 1982), daraus isoliert und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. 1 µl dieser Lösung wird für die Transformation von 100 µl kompetenten DH5α-Bakterien verwendet. Das Plasmid wird aus derjenigen Bakterienkolonie isoliert, die das nicht-mutierte Plasmid enthält.

### 2.2.2 SDS-PAGE

Die Proteine in einer Probe können in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dadurch aufgetrennt werden, daß Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht schneller durch das Gel laufen als Proteine mit höherem Molekulargewicht. Vor der Gelelektrophorese werden die Proteine durch SDS denaturiert (SDS-PAGE). Es werden zwei verschiedene SDS-PAGE-Systeme verwendet, wobei das System nach Lämmli für Proteine zwischen 10 und 100 kDa und das System nach Schägger/von Jagow für Proteine zwischen 2 und 30 kDa verwendet wird (Laemmli, 1970; Schägger und von Jagow, 1987).

Bei der SDS-PAGE nach Lämmli wird das Trenngel als kontinuierliches Gradientengel von 10 bis 17% Acrylamid verwendet, wobei zur Stabilisierung des Gels Glyzerin zugegeben wird. Das Sammelgel besteht aus 4% Acrylamid. Bei der SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow wird das Trenngel als Stufengradientengel von 10 bzw. 16,5% Acrylamid verwendet. Dabei wird ebenfalls Glyzerin zur Stabilisierung zugegeben. Das Sammelgel besteht aus 4% Acrylamid.

Wenn die Proteine als Lösung oder nach Immunopräzipitation an eine Sepharose-Matrix gebunden vorliegen, wird im Volumenverhältnis 1 : 1 2fach Probenpuffer nach Schägger/von Jagow zugegeben. Liegen die Proteine als Sediment nach TCA-Fällung vor, werden 50 µl 2fach Probenpuffer nach Schägger/von Jagow und 5 µl 3 M Tris/HCl (pH 8,0) zugemischt. Anschließend werden die Proben unter kräftigem Schütteln 5 Minuten bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei einem Lämmli-Gel unter ständiger Luftkühlung bei 60 mA durchgeführt, solange sich die Proteine im Sammelgel befinden und anschließend bei 90 mA für etwa 2,5 Stunden fortgesetzt, bis sich das Bromphenolblau und damit die Proteine mit dem geringsten Molekulargewicht am unteren Ende des Gels befinden. Bei einem Gel nach Schägger/von Jagow wird die Elektrophorese ebenfalls unter ständiger Luftkühlung bei 60 mA durchgeführt, solange sich die Proteine im Sammelgel befinden. Anschließend wird sie etwa 12 Stunden bei maximal 100 mA und 130 Volt fortgesetzt, bis sich der Serva Blue G-Farbstoff und damit die Proteine mit dem geringsten Molekulargewicht am unteren Ende des Gels befinden.

Die Proteine werden 30 Minuten (Lämmli) bzw. 60 Minuten (Schägger/von Jagow) in der Fixierlösung für Proteingele unter ständiger Bewegung des Gels fixiert und die Gele anschließend zwischen zwei Platten bei 80°C für 2,5 Stunden im Vakuum getrocknet. Gele mit radioaktiven Proben werden über Nacht auf Phosphorimager-Platten gelegt und die Signale der radioaktiven Proteine in einem Phosphorimager sichtbar gemacht. Gele mit nicht-radioaktiven Proben werden entweder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

## Methoden

### Spezifische Puffer/Lösungen:

SDS-PAGE-Gele nach Schagger/von Jagow:

Lösung I (48/1,5)	48% (w/v) Acrylamid, 1,5% (w/v) Bisacrylamid
Lösung II (46,5/3)	46,5% (w/v) Acrylamid, 3% (w/v) Bisacrylamid
Probenpuffer (2fach)	150 mM Tris/HCl (pH 6,8), 24% (w/v) Glyzerin, 8% (w/v) SDS, 2% (v/v) 2-ME (frisch zugegeben), 0,02% (w/v) Serva Blue G
Polymerisationspuffer	3 M Tris/HCl (pH 8,45), 0,3% (w/v) SDS
Laufpuffer (Kathode)	100 mM Trizin, 100 mM Tris, 1% (w/v) SDS
Laufpuffer (Anode)	200 mM Tris/HCl (pH 8,9)

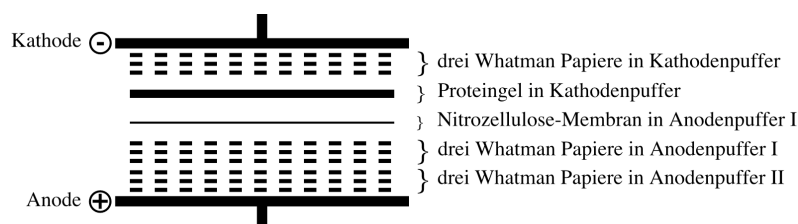
SDS-PAGE-Gele nach Lämmli:

SDS-PAGE-	77 mM Tris/HCl (pH 6,8), 37 mM DTT, 3,8 mM EDTA,
Probenpuffer (2fach)	7,7% (v/v) Glyzerin, 3% (w/v) SDS, 0,007% (w/v) Bromphenolblau
Fixierlösung für Proteingele	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

### 2.2.3 Western Blot

Proteine, die sich in Lösung befinden, können auf spezifische Weise nachgewiesen werden. Dazu werden sie zunächst in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der interessierenden Proteine auf der Membran erfolgt durch spezifische Antikörper. Die Antikörper können dabei entweder gegen das gesamte Protein oder ein kurzes Peptid aus der Aminosäure-Sequenz des Proteins gerichtet sein. An denjenigen Stellen auf der Membran, an denen sich das interessierende Protein bzw. Peptid befindet und spezifisch vom ersten Antikörper erkannt wurde, tritt im Röntgenfilm aufgrund der bei einer Chemolumineszenz-Reaktion ausgesendeten Lichtquanten eine Schwärzung auf.

Für diese "Western Blot" genannte Methode wird zunächst zwischen zwei ebenen, elektrisch leitenden Platten ein Stapel von Whatman 3MM Papieren, Nitrozellulose-Membran und SDS-PAGE-Proteingel aufgebaut. Dazu werden je drei Blätter Whatman 3MM Papiere in Anodenpuffer II, I und Kathodenpuffer getränkt, die Nitrozellulose-Membran in Anodenpuffer I und das SDS-PAGE-Proteingel in Kathodenpuffer gelegt.



**Abb. 4** Aufbau einer Western Blot-Apparatur

## Methoden

Auf die elektrisch leitende Platte, die später als Anode geschaltet werden wird, werden nun der Reihe nach je drei Blätter Whatman 3MM Papier in Anodenpuffer II und I gelegt, denen die Nitrozellulose-Membran folgt. Darauf werden das SDS-PAGE-Proteingel und drei Blätter Whatman 3MM Papier in Kathodenpuffer gestapelt. Auf diesen Stapel wird schließlich die zweite Platte gelegt, die als Kathode geschaltet werden wird. Ein konstanter Strom von 0,8 bis 1,0 mA pro cm<sup>2</sup> Stapelfläche wird für die Dauer von 60 Minuten angelegt. Dabei werden die Proteine des SDS-PAGE-Proteingels aufgrund ihrer negativen Gesamtladung, die auf das gebundene SDS zurück zu führen ist, auf die Nitrozellulose-Membran übertragen.

Die Nitrozellulose-Membran wird nun mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Kontrolle, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran übertragen wurden, werden die übertragenen Proteine mit PonceauS-Lösung angefärbt und die gefärbte Membran anschließend mit TBST entfärbt. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran werden durch Schwenken der Membran in Block-Puffer abgesättigt. Anschließend wird der Block-Puffer im Verhältnis 1 : 5 mit TBS verdünnt und der erste Antikörper, der gegen das interessierende Protein gerichtet ist, in einer bestimmten Verdünnung (meist 1 : 1.000 bis 1 : 5.000) zugegeben. Die Membran wird in dieser Lösung über Nacht bei 4°C geschwenkt und anschließend fünfmal je 5 Minuten mit TBST gewaschen. Der zweite Antikörper wird in einer Verdünnung von 1 : 5.000 zu der Antikörper-Lösung gegeben, die Membran bei Raumtemperatur darin für 20 Minuten geschwenkt und anschließend wiederum fünfmal je 5 Minuten mit TBST gewaschen. Die gewaschene Membran wird für die Dauer von 1 Minute mit der Western Blot-Entwicklerlösung gespült und dadurch die Chemolumineszenz-Reaktion gestartet. Die Membran wird in eine durchsichtige Folie eingehüllt. Im Dunkeln werden anschließend Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiträume auf das Proteingel gelegt und damit dem Licht der Chemolumineszenz ausgesetzt. Anschließend werden die Röntgenfilme entwickelt.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Anodenpuffer I	30 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	300 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,01% (w/v) SDS
PonceauS-Lösung	1% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) PonceauS
Block-Puffer	137 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,4), 10% (w/v) Milchpulver, 0,5% (v/v) Tween-20, 0,01% (w/v) NaN <sub>3</sub>
Antikörper-Lösung	137 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2% (w/v) Milchpulver, 0,05% (v/v) Tween-20
Entwickler-Lösung	99% (v/v) Substrat-Lösung A, 1% (v/v) Start-Lösung B
TBS-Puffer	137 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
TBST-Puffer	137 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,05% (v/v) Tween-20

## Methoden

---

### 2.2.4 *In vitro* Translations-/Translokationssystem

Mit einem zellfreien *in vitro* Translations-/Translokationssystem ist es möglich, nicht nur die Translation von Proteinen, sondern auch die Translokation dieser Proteine über bzw. die Insertion in die ER-Membran zu untersuchen. Die Translokation kann unter definierten Bedingungen in einzelnen Schritten einschließlich der Abspaltung einer Signalsequenz (SS) charakterisiert werden.

Das Translationssystem besteht im Wesentlichen aus einem zytosolischen Zellextrakt, radioaktiven Aminosäuren und einer mRNA, die für ein verkürztes Protein kodiert und kein Stop-Kodon besitzt. Diese mRNA wird hergestellt, indem eine cDNS innerhalb der kodierenden Region durch ein Restriktionsenzym gespalten und *in vitro* transkribiert wird. Das zytosolische Zellextrakt besteht entweder aus Weizenkeim-Extrakt oder Retikulozyten-Lysat. Durch Zugabe von Rauhen Mikrosomen (RM), die aus der Bauchspeicheldrüse von Hunden gewonnen werden, kann das Translationssystem schließlich zu einem Translations-/Translokationssystem erweitert werden.

Die mRNA wird in diesem System translatiert und die entstehende Polypeptidkette kotranslational in das Translokon der RM-Membran inseriert. Da die verwendete mRNA kein Stop-Kodon besitzt, kann die naszierende Polypeptidkette nach Abschluß der Translation nicht vom Ribosom entlassen und vollständig über die RM-Membran transloziert werden. Der Komplex aus Ribosom, mRNA, naszierender Polypeptidkette und RM ist stabil. Die naszierenden Polypeptidketten können anschließend synchron durch Puromycin-Behandlung von den Ribosomen entlassen und transloziert werden. Dabei kann es zu einer Abspaltung der SS kommen.

#### 2.2.4.1 Herstellung des Weizenkeim-Extraktes

Zur Verhinderung der Keimung erfolgt die Lagerung unbehandelter Weizenkeime trocken bei 4°C unter Luftausschluß. Die Weizenkeime werden mechanisch aufgeschlossen und die schweren Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die leichten Bestandteile bezeichnet man als 23S Weizenkeim-Extrakt, das unter anderem die Komponenten für die Translation enthält. Bei der Isolierung dieses Extraktes über eine Ausschlußsäule werden Moleküle und Proteinkomplexe mit niedrigem Molekulargewicht zurück gehalten, während höher molekulare Komponenten durchfließen und gesammelt werden. In diesem Durchlauf befinden sich unter anderem Ribosomen und daran gebundene Faktoren, die für die Translation wichtig sind. Zur Benutzung dieses Weizenkeim-Extraktes in einer *in vitro* Translations-/Translokationsreaktion wird eine einzelne Fraktion lediglich einmal aufgetaut, da sie bei wiederholtem Einfrieren stark an Aktivität verliert.

Für die Herstellung des Weizenkeim-Extraktes werden 3 Gramm Weizenkeime in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser in kurzer Zeit zu einem sehr feinen Pulver zerrieben. Das Weizenkeim-Pulver wird in einen eisgekühlten Mörser überführt, 4,5 ml Puffer H dazu



## Methoden

gegeben und zu einer Suspension verrieben. Schrittweise werden weitere 10,5 ml Puffer H zu gegeben und die Suspension weiter zerrieben. Anschließend wird die Weizenkeim-Suspension zentrifugiert (4°C, 23.000\*g, 10 Minuten) und der entstandene Überstand bis auf 1 ml, der auf dem Sediment belassen wird, abgenommen. Der entnommene Überstand wird erneut zentrifugiert (4°C, 23.000\*g, 10 Minuten), wie zuvor bis auf 1 ml vom Sediment abgenommen und wird als 23S Weizenkeim-Extrakt bezeichnet. Das 23S Weizenkeim-Extrakt wird auf eine zuvor bereitete Säule gegeben. Die Füllung dieser 1,5 x 40 cm großen Säule besteht aus Sephadex G25-Partikeln, die zuvor in Puffer C autoklaviert wurden. Die Säule wird anschließend mit Puffer C eluiert. Sobald der Durchlauf trübe wird, werden 2 ml-Fraktionen gesammelt. Die ersten drei Fraktionen werden verworfen. Die Fraktionen 4 bis 6 werden 10 Minuten auf Eis stehen gelassen, um die Bildung von Aggregaten zu erlauben, anschließend zentrifugiert (4°C, 30.000\*g, 10 Minuten), die entstandenen Überstände isoliert und vereinigt. Die Überstände werden in 50 bis 150 µl-Teilmengen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Puffer H	100 mM KOAc, 40 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben)
Puffer C	50 mM KOAc, 40 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 1 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 0,1% (v/v) 2-ME (frisch zugegeben)

#### 2.2.4.2 Herstellung von Rauhen Mikrosomen (RM)

Die für eine Translations-/Translokations-Reaktion benötigten Rauhen Mikrosomen (RM) können aus der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) von Hunden hergestellt werden (Walter und Blobel, 1983a). Das in den Zellen des Pankreas in großem Ausmaß vorhandene ER wird dabei in RM umgewandelt, welche die Eigenschaften des ER beibehalten. Damit die RM ihre Translokationsaktivität behalten, werden alle Bearbeitungsschritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Für die Herstellung der Rauhen Mikrosomen wird einem Hund das Pankreas entnommen und in 300 ml STKMM gegeben. Fettgewebe und Blutgefäße werden herausgeschnitten und die Bauchspeicheldrüse in kleine Stücke zerteilt. Das Gewebe wird durch eine Gewebepresse gepreßt und anschließend mit STKMM auf 200 ml aufgefüllt. Das Gewebe wird in etwa 30 ml Portionen unter Verwendung eines Potter-Elvehjem-Homogenisators homogenisiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 1.100\*g, 10 Minuten). Die auf der Oberfläche der Überstände schwimmende weißliche Fettschicht wird abgesaugt und verworfen. Ausschließlich die Überstände der weißen Lösung, welche sich direkt über dem Sediment befindet, werden vereinigt. Das Sediment wird in STKMM resuspendiert, homogenisiert und

## Methoden

erneut zentrifugiert (4°C, 1.100\*g, 10 Minuten). Der entstandene Überstand wird wie zuvor abgenommen und die Überstände beider Zentrifugationen vereinigt.

Für die Herstellung eines Saccharose-Stufen-Dichtegradienten werden jeweils 10 ml 2 M, 1,75 M und 1,5 M Saccharose-TKMM vorsichtig über einander geschichtet. Anschließend werden die vereinigten Überstände vorsichtig auf diesen Gradienten geschichtet und zentrifugiert (4°C, 235.000\*g, 12 Stunden).

Durch diese Zentrifugation werden die Zellbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Dabei befindet sich das rötliche Zytosol innerhalb der 1,5 M und die weißliche RM-Suspension innerhalb der 1,75 M Saccharose-Schicht. Das Zytosol wird abgenommen und bei -80°C gelagert.

Die RM-Suspension wird ebenfalls abgenommen. Die Dichte dieser Suspension wird durch Zugabe von 2 Volumen RM-Puffer verringert. Anschließend wird die Suspension zentrifugiert (4°C, 235.000\*g, 1 Stunde). Dabei bilden die RM ein Sediment. Der Überstand wird nach der Zentrifugation verworfen und das Sediment in insgesamt 60 ml RM<sup>+</sup>-Puffer resuspendiert. Anschließend wird diese Suspension im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Die Konzentration der RM wird über das 260/280 nm-Verhältnis bestimmt, wobei ein Äquivalent RM einer Optischen Dichte OD<sub>260</sub> von 1 entsprechen. Durch Zugabe von RM<sup>+</sup>-Puffer wird eine Konzentration von 1 eq/μl eingestellt. Die homogenisierten RM werden anschließend in kleinen Teilmengen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Qualität der RM wird kontrolliert, indem ein Western Blot unter Verwendung eines anti-SRP54- und eines anti-Sec61β-Ak durchgeführt wird. Außerdem wird die Translokationseffizienz in einer *in vitro* Translations-/Translokationsreaktion überprüft.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

RM <sup>+</sup> -Puffer	250 mM Saccharose, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 50 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 μg/ml PMSF (frisch zugegeben)
RM <sup>-</sup> -Puffer	50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 50 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 μg/ml PMSF (frisch zugegeben)
TKMM-Puffer	100 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 50 mM KOAc, 6 mM Mg (OAc) <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 μg/ml PMSF (frisch zugegeben)
STKMM-Puffer	250 mM Saccharose, 100 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 50 mM KOAc, 6 mM Mg (OAc) <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 μg/ml PMSF (frisch zugegeben)

## Methoden

---

### 2.2.4.3 Isolierung des Signalerkennungspartikels (SRP)

In einer *in vitro* Translokationsreaktion kann SRP für die kotranslationale Translokation eines Proteins über die Membran des ER in höheren Eukaryonten ein limitierender Faktor sein. Die Zugabe von SRP zur Translokationsreaktion ermöglicht eine Erhöhung der Translokationseffizienz. Das SRP kann aus einem Hochsalzextrakt von RM isoliert werden (Walter und Blobel, 1983b). Die Isolierung des SRP erfolgt dabei durchgehend bei 4°C bzw. auf Eis.

Zur Isolierung des SRP werden 50 ml eines RM-Homogenisates auf 500 mM Kaliumazetat eingestellt und 15 Minuten bei 4°C bewegt. Diese Suspension wird auf ein 25 ml-Hochsalz-Saccharose-Kissen geschichtet und zentrifugiert (4°C, 120.000\*g, 1 Stunde). Der Überstand einschließlich des Saccharose-Kissens, jedoch ausschließlich des weißlichen RM-Sediments, wird abgenommen, erneut auf ein Hochsalz-Saccharose-Kissen geschichtet und zentrifugiert (4°C, 388.000\*g, 1 Stunde). Der Überstand ausschließlich des Saccharose-Kissens wird abgenommen und unter Verwendung einer Amicon-Apparatur auf etwa 10 ml konzentriert. Dazu wird eine YM100-Membran benutzt, die für Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 100.000 g/mol durchlässig ist. Das SRP wird also von der Membran zurück gehalten und reichert sich im Überstand an. Der konzentrierte Überstand wird auf eine Sephadex G-150-Gelfiltrationssäule geladen, die zuvor mit Gelfiltrationspuffer equilibriert wurde. Die Elution erfolgt ebenfalls unter Verwendung des Gelfiltrationspuffers mit einer Flußrate von 1 ml pro Minute. Die UV-Absorption des Eluates wird bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. 20 bis 25 ml derjenigen Eluatfraktionen, welche die höchsten UV-Absorptionen zeigen, werden gesammelt und vereinigt. Dieses Eluat enthält das SRP. Das Eluat wird sofort auf eine DEAE-Sepharose-Ionenaustauscher-Säule geladen, die zuvor mit Gelfiltrationspuffer equilibriert wurde. Die Bindung des SRP an das Säulenmaterial ist unter diesen Bedingungen abhängig von der Ionenstärke. Die an die DEAE-Sepharose gebundenen Proteine werden anschließend eluiert, indem Puffer mit schrittweise steigenden Kaliumazetat-Konzentrationen und damit steigenden Ionenstärken verwendet werden. Die Elution des SRP erfolgt hauptsächlich mit Elutionspuffer I. Die Flußrate beträgt 1 ml pro Minute. Die UV-Absorption des Eluats wird wieder bei 280 nm gemessen. 2 bis 3 ml derjenigen Eluatfraktionen, welche die höchsten UV-Absorptionen zeigen, werden gesammelt. Jede dieser Fraktionen wird auf ihren SRP-Gehalt mit Hilfe eines Western Blot unter Verwendung eines anti-SRP54-Ak untersucht. Zusätzlich wird durch eine *in vitro* Translations-/Translokationsreaktion die SRP-Aktivität festgestellt. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, in kleinen Teilmengen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## Methoden

---

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Gelfiltrationspuffer	250 mM KOAc, 50 mM Tris/OAc (pH 7,5), 2,5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 0,01% (w/v) Nikkol (frisch zugegeben)
Waschpuffer	350 mM KOAc, 50 mM Tris/OAc (pH 7,5), 3,5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 0,01% (w/v) Nikkol (frisch zugegeben)
Elutionspuffer I	650 mM KOAc, 50 mM Tris/OAc (pH 7,5), 6 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 0,01% (w/v) Nikkol (frisch zugegeben)
Elutionspuffer II	1 M KOAc, 50 mM Tris/OAc (pH 7,5), 6 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 0,01% (w/v) Nikkol (frisch zugegeben)

#### 2.2.4.4 *In vitro* Transkription

Von einer cDNS kann eine mRNA *in vitro* synthetisiert werden. Dazu wird in das Plasmid auf der 5'-Seite der inserierten cDNS ein SP6- oder T7-Promotor eingefügt. Unter Verwendung einer SP6- bzw. T7-Polymerase kann ausgehend vom jeweiligen Promotor die entsprechende mRNA synthetisiert werden. Damit die Polymerase nicht vom gesamten Plasmid eine einzige mRNA synthetisiert, wird das Plasmid zuvor entweder innerhalb der kodierenden Region oder auf der 3'-Seite dieser Region mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Im ersten Fall entsteht eine mRNA, die kein Stop-Kodon besitzt und im zweiten Fall eine mRNA einschließlich des Stop-Kodons.

Bei der Herstellung der mRNA ohne Stop-Kodon, die für das pPL<sub>86</sub> bzw. \*pGP-C<sub>142</sub> und pGP-C<sub>142</sub> kodieren, werden die entsprechenden Plasmide innerhalb der kodierenden Regionen mit den Restriktionsenzymen Pvu II bzw. Xho I linearisiert und transkribiert. Bei der Herstellung der mRNA mit Stop-Kodon, die für das \*SS<sup>GP-C</sup>, \*SS<sup>GP-C</sup>-PL und pGP-C<sub>142</sub>-HA kodieren, werden die entsprechenden Plasmide auf der 3'-Seite der kodierenden Regionen mit dem Restriktionsenzym Esp I linearisiert und transkribiert.

Dazu werden in vorgelegtes H<sub>2</sub>O 2,5 µl RNasin, 20 µg linearisiertes Plasmid, 10 µl CAP-Analogon (5 mM), 20 µl 5facher T7/SP6-Puffer und 10 µl T7-Polymerase bzw. 5 µl SP6-Polymerase gegeben, so daß ein Volumen von 100 µl entsteht. Die Reaktion wird bei 42°C über zwei Stunden durchgeführt. Anschließend wird die mRNA isoliert, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

SP6/T7-Puffer (5fach)	200 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM DTT, 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 10 mM TTP, 5 mM Spermidin
--------------------------	--

## Methoden

### 2.2.4.5 Translations-/Translokationsreaktion

Für die Translationsreaktion (in Abwesenheit von RM/SRP) bzw. Translations-/Translokationsreaktion (in Anwesenheit von RM/SRP) unter der Verwendung des Weizenkeim-Extraktes bzw. des Retikulozyten-Lysates werden die angegebenen Volumina der einzelnen Komponenten zusammengegeben.

Bei der Verwendung des Akzeptor-Tripeptids wird aber zunächst dasjenige Volumen der Akzeptor-Tripeptid-Lösung vorgelegt, das gebraucht wird, um in der Reaktion eine Endkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  herzustellen. Das Lösungsmittel Methanol wird zunächst im Vakuum verdampft und anschließend die einzelnen Komponenten der Translations- bzw. Translations-/Translokationsreaktion zum Akzeptor-Tripeptid gegeben.

Translations-/Translokationsreaktion mit pPL<sub>86</sub>:

Weizenkeim		Retikulozyten-Lysat	
-RM/SRP	+RM/SRP	-RM/SRP	+RM/SRP
6 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O		-	
1 $\mu\text{l}$ Salzmischung 50		7 $\mu\text{l}$ Retikulozyten-Lysat	
2 $\mu\text{l}$ RM-Puffer	2 $\mu\text{l}$ RM	0,9 $\mu\text{l}$ RM-Puffer	0,9 $\mu\text{l}$ RM
2 $\mu\text{l}$ SRP-Puffer	2 $\mu\text{l}$ SRP	0,9 $\mu\text{l}$ SRP-Puffer	0,9 $\mu\text{l}$ SRP
2 $\mu\text{l}$ Energiemischung		0,2 $\mu\text{l}$ RNasin Ribonuklease-Inhibitor	
10 $\mu\text{l}$ Weizenkeimextrakt		0,2 $\mu\text{l}$ Aminosäure-Mischung (ohne Methionin/Cystein)	
1 $\mu\text{l}$ <sup>35</sup> S-Methionin/Cystein		0,4 $\mu\text{l}$ <sup>35</sup> S-Methionin/Cystein	
1 $\mu\text{l}$ pPL <sub>86</sub> -mRNS		0,4 $\mu\text{l}$ pPL <sub>86</sub> -mRNS	
$\Sigma$ 50 $\mu\text{l}$		$\Sigma$ 10 $\mu\text{l}$	

Die Zusammensetzung der Translations-/Translokationsreaktion für pGP-C<sub>142</sub> ist bis auf eine Ausnahme die gleiche wie beim pPL<sub>86</sub>. Bei der Verwendung des Weizenkeim-Extraktes wurde statt der Salzmischung 50 die Salzmischung 25 verwendet.

Bei der Verwendung des Retikulozyten-Lysates bzw. Weizenkeim-Extraktes wird die Translations-/Translokationsreaktion 20 Minuten bei 30°C bzw. 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Behandlungen, die sich anschließen können, werden unabhängig vom Lysat/Extrakt unter denselben Bedingungen durchgeführt:

- Puromycin (Endkonzentration 2 mM): 10 Minuten, 25°C
- Hochsalzbedingungen (Endkonzentrationen 500  $\mu\text{M}$  KOAc, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>): 15 Minuten, auf Eis
- Ultrazentrifugation durch ein Saccharose-Kissen: 4°C, 100.000\*g, 3 Minuten
- Proteinase K (Endkonzentration 0,5 g/l): 30 Minuten, auf Eis, anschließend die Reaktion kurz auf RT bringen und dann PMSF (Endkonzentration 2 bis 8 g/l): 30 Minuten, auf Eis

## Methoden

---

- Triton X-100 (Endkonzentration 1% (v/v)): auf Eis mischen  
- Carbonat-Extraktion (Endkonzentration 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 15 Minuten, Eis, anschließend Ultrazentrifugation durch ein alkalisches Saccharose-Kissen (4°C, 130.000\*g, 10 Minuten)  
Wenn das Lysat nicht zuvor durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharose-Kissen abgetrennt wurde, werden zur Aufbereitung der Proben beim Retikulozyten-Lysat 2 Volumina gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben, zentrifugiert (4°C, 18.000\*g, 5 Minuten), der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend werden 200 µl Ethanol (gekühlt auf -20°C) zugegeben, zentrifugiert (RT, 3.800\*g, 2 Minuten) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird anschließend in Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C kräftig geschüttelt.

Wenn das Retikulozyten-Lysat zuvor abgetrennt wurde, werden diese Proben wie die Proben des Weizenkeimes behandelt. Dabei werden durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10% (v/v)), Inkubation von 30 Minuten auf Eis und Zentrifugation (4°C, 6.000\*g, 3 Minuten) die Proteine sedimentiert und der Überstand verworfen. Zum Sediment werden anschließend 50 µl Probenpuffer und 5 µl 3M Tris/HCl (pH 8,0) gegeben und 5 Minuten bei 95°C kräftig geschüttelt.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Energiemischung	100 mM Kreatinphosphat, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 10 mM ATP, 0,2 mM GTP, 0,2 mM jeder Aminosäure außer Methionin bzw. Methionin/Cystein, 5 g/l Kreatinkinase
Salzmischung 25	1 M KOAc, 500 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>
Salzmischung 50	1 M KOAc, 500 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 50 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>
SRP-Puffer	650 mM KOAc, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>
Hochsalzlösung	1,5 M KOAc, 15 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>
Alkalisches Saccharose-Kissen	250 mM Saccharose, 100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Saccharose-Kissen (hohe Salzkonzentration)	500 mM Saccharose, 500 mM KOAc, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)
Saccharose-Kissen (niedrige Salzkonzentration)	500 mM Saccharose, 50 mM KOAc, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 2 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 1 mM DTT (frisch zugegeben), 10 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)

### 2.2.5 Herstellung von Antikörpern

Polyklonale Antikörper, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, können mit Hilfe von Kaninchen hergestellt werden. Dabei kann als Antigen ein isoliertes Protein oder ein synthetisches Peptid, das einen Teil der Aminosäure-Sequenz eines Proteins enthält, verwendet werden. Solche Peptide, die aus 10 bis 15 Aminosäuren bestehen, werden zunächst

## Methoden

---

an ein Hapten gekoppelt, welches unabhängig vom gebundenen Peptid als Antigen wirken kann. Erst dadurch kann das Immunsystem der Kaninchen das Peptid als Antigen erkennen und Antikörper gegen das Hapten und das daran gekoppelte Peptid bilden. Als Hapten wurde KLH verwendet.

Vor der Immunisierung wird den Kaninchen Blut abgenommen, das zum Präimmunserum aufbereitet wird und keine spezifischen Antikörper besitzen sollte. Das Antigen wird zunächst in einem Öl von Freund's Adjuvant emulgiert. Dadurch bilden sich nach subkutaner Applikation dieser Emulsion unter der Haut der Kaninchen Öltropfen, die das Antigen kontinuierlich abgeben und dadurch eine ständige Aktivierung des Immunsystems bewirken. Zusätzlich werden der Emulsion bei der ersten Immunisierung der Kaninchen Bestandteile von abgetöteten Bakterien beigemischt. Diese bakteriellen Fragmente lösen eine unspezifische Immunantwort aus und aktivieren gleichzeitig das gesamte Immunsystem der Kaninchen. Bei den nachfolgenden Immunisierungen, die zur Reaktivierung der nachlassenden Immunantwort nötig sind, dient der Hapten-Peptid-Komplex selbst der Aktivierung einer erneuten Immunantwort. Daher wird auf die weitere Zugabe der bakteriellen Fragmente verzichtet.

### 2.2.5.1 Peptid-Kopplung an KLH

#### 2.2.5.1.1 Peptid-Kopplung an KLH mit Glutaraldehyd

Die Kopplung des Peptids an KLH kann über deren Lysin-Seitenketten und terminale Amin-Gruppen unter Verwendung von Glutaraldehyd als Kopplungsreagenz erfolgen. Die gesamte Reaktion wird bei 4°C durchgeführt.

Für die Immunisierung von zwei Kaninchen mit demselben Peptid werden 6 mg Peptid in 1 ml PBS gelöst und 3 mg KLH in 300 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Anschließend wird eine Lösung von 96 µl Glutaraldehyd (25%ig) in 1.100 µl PBS langsam zur Peptid-Lösung getropft und 60 Minuten bewegt. Zur Inaktivierung von überschüssigem Glutaraldehyd werden vorsichtig 26 mg Natriumborhydrid zugegeben und 45 Minuten bewegt.

#### 2.2.5.1.2 Peptid-Kopplung an KLH mit Sulfo-SMCC

Die Kopplung des Peptids kann über dessen Cystein- an die Lysin-Seitenketten bzw. terminalen Amin-Gruppen des KLH unter Verwendung von Sulfo-SMCC als Kopplungsreagenz erfolgen. In einem ersten Schritt wird das KLH an Sulfo-SMCC gebunden und das Reaktionsprodukt isoliert. Anschließend wird das Reaktionsprodukt an das Peptid gekoppelt.

Für die Immunisierung von zwei Kaninchen mit demselben Peptid werden für die erste Kopplungsreaktion 5 mg KLH und 3,5 mg Sulfo-SMCC gemischt, die zuvor in jeweils 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst wurden. Die Lösung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur bewegt und anschließend

## Methoden

---

zentrifugiert (4°C, 20.000\*g, 6 Minuten). Der Überstand wird auf eine G25 NAP10-Säule gegeben, die zuvor mit PBS equilibriert wurde. Mit 1,5 ml PBS wird das Reaktionsprodukt von der Säule eluiert. Das Eluat wird für den zweiten Kopplungsschritt mit 5 mg Peptid, das zuvor in 500 µl PBS gelöst wurde, gemischt und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur bewegt.

### 2.2.5.2 Dialyse der Kopplungsreaktionslösung

Die Kopplungsreaktion enthält Bestandteile, die negativ auf die Gesundheit der zur Produktion von Antikörpern benutzen Kaninchen wirken und außerdem unerwünschte Immunantworten auslösen könnten. Daher werden diese Bestandteile durch eine Dialyse entfernt. Die Kopplungsreaktion wird dabei in einen Dialyse-Schlauch gegeben und dieser fest verschlossen. Der Schlauch wird anschließend mehrmals hintereinander in Gefäße mit PBS gegeben, wobei die Dialyse erfolgt. Der für die Dialyse benutzte Dialyseschlauch ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als  $(12 - 14) \cdot 10^3$  g/mol durchlässig. Daher können lediglich KLH und das an KLH gekoppelte Peptid nicht durch die Schlauch-Membran diffundieren. Alle niedermolekularen Bestandteile können hingegen durch die Membran in die umgebende PBS-Lösung diffundieren und anschließend abgetrennt werden.

Die KLH-Peptid-Lösung wird dreimal jeweils 2 Stunden gegen leichte gerührte 300 ml PBS und anschließend ein weiteres Mal über Nacht gegen ebenfalls bewegte 1.000 ml PBS dialysiert. Nach der Dialyse wird die KLH-Peptid-Lösung aus dem Schlauch genommen, eingefroren und bei -20°C gelagert.

### 2.2.5.3 Herstellung der Emulsion mit Freund's Adjuvant

Für die Erstimmunisierung der Kaninchen wird komplettes Freund's Adjuvant verwendet, das Bakterien-Fragmente enthält. Für alle weiteren Immunisierungen wird das nicht komplette Adjuvant verwendet, das diese Fragmente nicht enthält.

Zu 300 µl der dialysierten KLH-Peptid-Lösung werden in einem Eppendorf-Gefäß jeweils 300 µl PBS und Freund's Adjuvant (komplett bzw. nicht komplett) gegeben. Zur Herstellung der Emulsion wird das Gefäß 10 Minuten bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Es erfolgen zwei weitere Zugaben von jeweils 150 µl Adjuvant mit anschließendem kräftigem Schütteln für 10 Minuten. Die Emulsion wird danach 10 Minuten auf Eis gestellt, weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt und schließlich in zwei Spritzen mit jeweils etwa 600 µl aufgezogen. Bis zur Immunisierung der Kaninchen werden diese auf Eis gehalten.

### 2.2.5.4 Immunisierung von Kaninchen

Dem neu in der Versuchstierhaltung eingetroffenen Kaninchen wird zunächst eine Eingewöhnungszeit von zwei Wochen gewährt. Nach dieser Zeit wird dem Kaninchen Blut



## Methoden

---

abgenommen und zum Präimmunserum aufbereitet. Dieses wird darauf getestet, ob es Antikörper enthält, die das KLH-gekoppelte Peptid erkennen. Wenn dieses Serum keine entsprechenden Antikörper enthält, ist das Kaninchen für die Herstellung der anti-Peptid-Antikörper geeignet und wird mit dem KLH-gekoppelten Peptid immunisiert. Vier Wochen nach dieser Immunisierung wird dem Kaninchen wieder Blut abgenommen, dieses zum Serum aufbereitet und darauf getestet, ob es Antikörper gegen das Peptid (nicht KLH-gekoppelt) enthält. Wenn das Kaninchen einen anti-Peptid-Antikörper herstellt, kann die Immunantwort gesteigert bzw. aufrecht erhalten werden, indem erneut mit dem KLH-gekoppelten Peptid immunisiert wird. Nach jeder weiteren Immunisierung wird zwei Wochen gewartet, bis die Immunantwort am höchsten ist und erst zu diesem Zeitpunkt Blut abgenommen. Nach jeder Blutabnahme wird zwei Wochen gewartet, bis die Immunantwort abgeklungen ist und erneut immunisiert werden kann.

### 2.2.6 Antikörper-Isolierung durch Affinitätschromatographie

Die polyklonalen Antikörper, die von den Kaninchen nach der Immunisierung mit dem KLH-Peptid gebildet werden, werden in deren Blut sezerniert. Aus dem Blut kann das Blutserum mit den gelösten Antikörpern isoliert werden. Allerdings befinden sich auch Antikörper in diesem Serum, die gegen andere Antigene als dem Peptid gerichtet sind. Diese Antikörper könnten in einem Western Blot oder einer Immunopräzipitation ein unspezifisches Signal liefern und die daraus resultierenden Ergebnisse falsch interpretiert werden. Dies kann verhindert werden, indem nur diejenigen Antikörper, die aufgrund der Immunisierung der Kaninchen mit dem KLH-Peptid gebildet wurden und nur das Peptid erkennen, isoliert werden. Dazu wird als erster Reinigungsschritt eine Ammoniumsulfat-Fällung und anschließend eine Dialyse gegen PBS durchgeführt. Daraus resultiert eine an Antikörpern angereicherte Protein-Lösung. Für den zweiten Reinigungsschritt wird eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Daraus resultiert eine Lösung, welche die spezifischen Antikörper gegen das Peptid enthält.

#### 2.2.6.1 Blutaufbereitung

Das von den Kaninchen gewonnene Blut läßt man 1 Stunde bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C gerinnen. Nach Zentrifugation (4°C, 1.600\*g, 10 Minuten) wird das Serum als farbloser Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.6.2 Ammoniumsulfat-Fällung der Antikörper und Dialyse

Werden eine Proteinlösung, die auch Antikörper enthält, und eine gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 gemischt, fallen bestimmte Proteine einschließlich der Antikörper aus. Andere Proteine bleiben unter diesen Bedingungen

## Methoden

hingegen in Lösung. Diese Eigenschaft der Antikörper kann für einen ersten groben Reinigungsschritt verwendet werden. Nach einer Zentrifugation resultiert demnach ein an Antikörpern angereichertes Sediment, das anschließend vom Überstand abgetrennt wird.

Der zur anschließenden Dialyse benutzte Dialyseschlauch ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als  $(12 - 14) \cdot 10^3$  g/mol durchlässig. Daher können die Antikörper mit einem Molekulargewicht ihrer leichten Ketten von  $25 \cdot 10^3$  g/mol, ihrer schweren Ketten von  $55 \cdot 10^3$  g/mol und insgesamt von mindestens  $160 \cdot 10^3$  g/mol nicht durch die Schlauch-Membran diffundieren. Die Membran ist hingegen für alle niedermolekularen Bestandteile wie das Ammoniumsulfat durchlässig.

5 ml Blutserum werden mit 5 ml der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung gemischt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation ( $4^\circ\text{C}$ ,  $11.000 \times g$ , 10 Minuten) wird der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml PBS gelöst. Es werden wiederum 5 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben, gemischt, 10 Minuten auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wird nun in 1 ml PBS gelöst und in einen Dialyseschlauch gegeben. Die Dialyse wird dreimal jeweils 2 Stunden gegen leichte gerührte 300 ml PBS und anschließend ein weiteres Mal über Nacht gegen ebenfalls bewegte 1.000 ml PBS durchgeführt. Nach der Dialyse wird die Protein-Lösung aus dem Schlauch genommen und für die anschließende Affinitätschromatographie verwendet.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Ammoniumsulfat-      Überschuß an Ammoniumsulfat in  $\text{H}_2\text{O}$  (bei  $4^\circ\text{C}$ )  
Lösung (gesättigt)

#### 2.2.6.3 Affinitätschromatographische Isolierung der Antikörper

Bei der Affinitätschromatographie wird die spezifische Bindung von Antikörpern an ihr Antigen ausgenutzt. Dabei wird an eine Sepharose-Matrix zunächst dasjenige Peptid kovalent gekoppelt, mit dem das KLH-Peptid hergestellt und das Kaninchen immunisiert wurde. In der anschließenden Chromatographie werden die spezifischen Antikörper gegenüber unspezifischen Antikörpern und anderen Proteinen angereichert.

##### 2.2.6.3.1 Kopplung des Peptids an eine NHS-aktivierte Sepharose-Matrix

Die Kopplung der NHS-aktivierten Matrix an das Peptid erfolgt über die terminale Amin-Gruppe des Peptids. Nach der Kopplung wird deren Effizienz grob durch Bestimmung der Menge des nicht gekoppelten Peptids, das im Überstand verbleibt, bei 280 nm gemessen. Diejenigen NHS-Gruppen, die nicht mit der Amin-Gruppe des Peptids reagiert haben, werden durch Zugabe von Tris inaktiviert. Anschließend wird die Peptid-Matrix gewaschen, um nicht-kovalent an die Matrix gebundene Peptide zu entfernen.

## Methoden

Zunächst wird die Matrix gewaschen, indem 2 ml der Matrix zentrifugiert (4°C, 60\*g, 1 Minute) und in 2 ml 1 mM HCl (pH 4,5) resuspendiert werden. Dieser Wasch-Schritt wird noch zweimal wiederholt und anschließend die Matrix insgesamt dreimal mit PBS gewaschen. Zu 2 ml Matrix wird nun 4 mg Peptid in 1 ml PBS gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur bewegt. Die Suspension wird zentrifugiert (4°C, 60\*g, 1 Minute), der resultierende Überstand abgenommen und die Menge an nicht gekoppeltem Peptid bestimmt. Die Peptid-Matrix wird in 2 ml 200 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wird die Peptid-Matrix einmal mit 300 mM Tris (pH 8,8), einmal mit PBS und einmal mit 300 mM Natriumazetat (pH 4,2) gewaschen. Diese Sequenz wird insgesamt dreimal durchgeführt. Schließlich wird noch zweimal mit PBS gewaschen. Die Lagerung der Peptid-Matrix erfolgt in 20% Ethanol in PBS bei 4°C.

### 2.2.6.3.2 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird die Protein-Lösung auf die Peptid-Matrix gegeben. An das Peptid binden hauptsächlich die für das gekoppelte Peptid spezifischen Antikörper. Die Matrix wird mehrmals gespült, wodurch lediglich die spezifisch gebundenen Antikörper an der Matrix verbleiben, während alle unspezifischen Antikörper und restlichen Bestandteile der Protein-Lösung herunter gewaschen und verworfen werden. Anschließend werden die spezifisch an das Peptid gebundenen Antikörper eluiert. Dies geschieht durch schrittweises Absenken des pH-Wertes, wodurch die Peptid-Antikörper-Bindung geschwächt wird und die Antikörper vom Peptid dissoziieren. Danach wird der pH-Wert im Eluat wieder auf einen für die Antikörper günstigen Bereich eingestellt. Die Antikörper können nun in einem Western Blot oder einer Immunopräzipitation verwendet werden, wobei sie spezifisch an ihr Antigen binden.

1 ml resuspendierte Peptid-Matrix wird zweimal mit PBS gewaschen, die Protein-Lösung nach der Dialyse dazu gegeben und 2 Stunden bei 4°C bewegt. Die Peptid-Matrix wird viermal mit PBS gewaschen. Die Elution der spezifisch an das Peptid gebundenen Antikörper erfolgt anschließend durch Zugabe von dreimal 400 µl und zweimal 1.500 µl 200 mM Glyzin (pH 2,5). Dabei wird das Eluat auf vorgelegte jeweils 10 bzw. 75 µl 3 M Tris (pH 8,0) gegeben. Das Eluat wurde entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert oder nach Einstellung von 0,02% (w/v) Natriumazid bei 4°C aufbewahrt. Die Peptid-Matrix wird zweimal mit PBS gewaschen und in 20% Ethanol in PBS bei 4°C gelagert.

### 2.2.7 Immunopräzipitation unter nativen oder denaturierenden Bedingungen

Antikörper binden spezifisch an ein Antigen, das unter anderem ein Protein oder Peptid sein kann. Ein bestimmter Antikörper bindet nur ein bestimmtes Antigen. Dieses Antigen kann entweder in seiner nativen oder in einer denaturierten Form vorliegen. Es gibt Antikörper, die zwischen diesen beiden Formen des Antigens unterscheiden. Andere Antikörper binden beide

## Methoden

Formen. Durch Zugabe von Protein A-Sepharose-Matrix, die über das Protein A unspezifisch den  $F_{ab}$ -Teil des Antikörpers bindet, kann der Antigen-Antikörper-Komplex isoliert werden.

Falls an das Antigen weitere Komponenten wie zum Beispiel Proteine gebunden sind, werden diese bei einer IP unter nativen Bedingungen ebenfalls isoliert.

Durch Zugabe eines Überschusses an SDS vor Beginn der IP werden alle Proteine denaturiert, und nicht-kovalente Bindungen von Komponenten zum Antigen unterbrochen. Das in Lösung befindliche SDS kann durch Zugabe eines Überschusses an Triton X-100 in Mizellen gebunden und damit inaktiviert werden. Weitere zu dieser Lösung gegebene Proteine werden durch das SDS nicht denaturiert. Durch anschließende Zugabe von Antikörpern kann das entsprechend denaturierte Antigen spezifisch vom Antikörper gebunden und isoliert werden. Hierbei handelt es sich dann um eine IP unter denaturierenden Bedingungen.

Bei einer nativen IP wird die Protein-Lösung auf 1% Triton X-100 eingestellt. Dadurch werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Lipiden gelöst und Membranproteine in Lösung überführt. Durch Zugabe von 1 \* CLAP-Mischung werden außerdem Proteasen inaktiviert. Liegen die Proteine hingegen in einem Sediment vor, wird statt dessen nativer Lysis-Puffer zugegeben und die Proteine darin resuspendiert.

Anschließend wird 1/10 Volumen Protein A-Sepharose zugegeben und 30 Minuten bei 4°C bewegt. Dabei können Proteine unspezifisch an die Protein A-Sepharose-Matrix binden. Diese unspezifisch gebundenen Proteine werden entfernt, indem nach Zentrifugation (4°C, 20.000\*g, 1 Minute) der Überstand abgenommen und die Protein A-Sepharose-Matrix verworfen wird. Zum Überstand wird ein Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 30 bis 1 : 50 gegeben und über Nacht bei 4°C bewegt. Dabei bindet der Antikörper spezifisch das Antigen. Zu dieser Lösung werden 30 µl Protein A-Sepharose gegeben und 1 Stunde bewegt. Das Protein A bindet nun an den Antikörper-Antigen-Komplex. Nach Zentrifugation (4°C, 20.000\*g, 2 Minuten) wird der Überstand abgenommen und die Matrix jeweils zweimal mit 1,25 ml IP-Waschpuffer A, B und C gewaschen. Dabei werden unspezifische Bindungen gelöst. Am Ende dieser Waschschrte befindet sich der Komplex aus Antigen-bindenden Komponenten, Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose in einer Lösung von 10 mM Tris (pH 7,5).

Bei einer denaturierenden IP wird die Protein-Lösung auf 1% SDS eingestellt und 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Dadurch werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Lipiden gelöst, Membranproteine in Lösung überführt und alle Proteine denaturiert. Durch Zugabe von 1 \* CLAP-Mischung werden außerdem Proteasen inaktiviert. Anschließend werden 20 Volumen nativer Lysis-Puffer zugegeben. Danach werden analog zur nativen IP unspezifisch an die Matrix bindende Proteine entfernt, Antikörper zugegeben und die Matrix gewaschen. Am Ende der Waschschrte befindet sich der Komplex aus Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose in einer Lösung von 10 mM Tris (pH 7,5).

Nach der IP kann eine Behandlung mit Endo H oder PNGase F angeschlossen werden. Dazu wird zu der gewaschenen Protein A-Sepharose-Matrix 1/10 Volumen 10fach Glykosidase-

## Methoden

Denaturierungspuffer gegeben und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Für die Endo H-Behandlung werden anschließend 1/10 Volumen 10fach Endo H-Reaktionspuffer und 1.000 U Endo H dazu gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der Behandlung mit PNGase F werden statt dessen 1/10 Volumen 10fach G7-Puffer, 1/10 Volumen 10fach NP-40-Lösung und 100 U PNGase F dazu gegeben und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Lysis-Puffer (nativ)	100 mM NaCl, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,3), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% (v/v) Triton X-100, 1 * CLAP-Mischung, 100 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)
Lysis-Puffer (denaturierend)	100 mM NaCl, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,3), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% (w/v) SDS, 1 * CLAP-Mischung, 100 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)
Waschpuffer A	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,4% (v/v) Triton X-100
Waschpuffer B	500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,2% (v/v) NP-40
Waschpuffer C	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
Glykosidase-	10% (v/v) 2-ME, 5% (w/v) SDS
Denaturierungspuffer (10fach)	
Endo H-Reaktions- puffer (10fach)	500 mM Natriumzitrat (pH 5,5)

### 2.2.8 Transfektion von kultivierten Zellen

#### 2.2.8.1 Kultivierung von Eukaryontenzellen

Bestimmte Eukaryonten-Zellen eines definierten Ursprungs können als Zelllinie kultiviert und vermehrt werden. Dadurch können Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt werden. Die Zellen wachsen unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkultur-Schalen und sind mit einem Nährmedium überschichtet. Am Boden dieser Schalen können sich adherente Zellen als Ein-Zell-Schicht anheften und vermehren. Die meisten Zelllinien besitzen eine Kontaktinhibition, wodurch die Zellen absterben, wenn die Zelldichte in den Schalen zu groß wird. Daher müssen adherente Zellen in regelmäßigen Abständen unter sterilen Bedingungen von der Schale abgelöst und in geringerer Zahl auf einer neuen Schale ausgesät werden. Anschließend setzen sich die Zellen wieder auf dem Boden ab, wo sie sich verankern und weiter wachsen können.

## Methoden

In einer sterilen Reinbank wird das Nährmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Abgestorbene Zellen, die sich vom Boden abgelöst haben, werden dadurch herunter gewaschen und entfernt. Die lebenden Zellen werden mit Trypsin-EDTA überschichtet. Die Proteinase Trypsin spaltet Proteine an der Oberfläche der Zellen, wodurch sowohl der Zell-Zell-Kontakt als auch die Verankerung zum Schalenboden unterbrochen wird. Nachdem sich die Zellen vom Schalenboden gelöst haben, wird im Überschuß Nährmedium zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend werden 5 bis 10% der Zellen mit frischem Nährmedium auf einer neuen Schale ausgesät und im Brutschrank weiter kultiviert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Nährmedium	DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS, 1 * Glutamin, 1 * Penicillin/Streptomycin
------------	--

#### 2.2.8.2 Einfrieren von eukaryontischen Zellen

Für eine längere Lagerung können eukaryontische Zellen eingefroren und wieder aufgetaut werden, so daß sie anschließend wie zuvor kultiviert werden können.

Dazu werden die adherenten Zellen mit Trypsin-EDTA behandelt, von der Zellkultur-Schale abgelöst, vereinzelt, zentrifugiert (RT, 400\*g, 5 Minuten), der Überstand verworfen und die Zellen in eiskaltem Einfrier-Medium resuspendiert. Je 1 ml der Zell-Suspension wird auf eisgekühlte Kryoröhrchen verteilt und über Nacht langsam in einer Styroporschachtel bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag werden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C überführt und darin leicht bewegt. Sobald alle Eiskristalle geschmolzen sind, wird die Zell-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 5 ml Nährmedium dazu gegeben, die Suspension zentrifugiert (RT, 400\*g, 5 Minuten), der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert. Diese Zell-Suspension wird auf eine Zellkultur-Schale gegeben. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Schale abgesetzt haben, werden sie zweimal mit PBS gewaschen, neues Nährmedium dazu gegeben und die Zellen zur weiteren Verwendung vermehrt.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Einfrier-Medium	80% (v/v) DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO
-----------------	--

## Methoden

---

### 2.2.8.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Plasmid-DNS

Kultivierte Eukaryontenzellen können als lebende Modelle zur Untersuchung zellulärer Prozesse verwendet werden. Dazu kann Plasmid-DNS, auf der ein bestimmtes Protein kodiert ist, in diese Zellen eingeschleust werden. Die Plasmid-DNS gelangt über einen bisher unbekannten Mechanismus in den Zellkern und die Zelle kann die auf der DNS kodierten Proteine anschließend exprimieren. Damit ist es möglich, die Funktion von bestimmten Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen.

Die Einschleusung von Plasmid-DNS in Zellen kann durch eine Elektroporation oder unter Verwendung von Kalziumphosphat durchgeführt werden.

#### 2.2.8.3.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird eine Suspension von zu transfizierenden Zellen in einer Lösung, die Plasmid-DNS enthält, einem Stromstoß ausgesetzt. Die Zellmembran der Zellen wird infolge dieses Stromstoßes kurzzeitig durchlässig. Während dieser Zeit kann die Plasmid-DNS in die Zellen gelangen.

Zellen, die zu etwa 80% konfluent gewachsen sind, werden durch Trypsin-EDTA-Behandlung von der Zellkultur-Schale abgelöst und zentrifugiert (RT, 700\*g, 2 Minuten). Der Überstand wird verworfen und die Zellen in HEBS-Puffer resuspendiert. Anschließend werden sie ein weiteres Mal mit HEBS-Puffer gewaschen.  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 400 µl HEBS werden abgenommen und in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Zu dieser Zellsuspension werden 20 µg Plasmid-DNS in einem möglichst kleinen Volumen gegeben. Die Elektroporation erfolgt durch einen kurzen Stromstoß von 960 µF und 130 V. Anschließend wird die Küvette 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Zellen Zeit zum Aufbau ihres elektrochemischen Potentials haben. Die elektroporierten Zellen werden auf einer neuen Zellkultur-Schale ausgesät. Nach 12 Stunden wird das Nährmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Die Zellen werden anschließend weitere 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während dieser Zeit kann das auf der Plasmid-DNS kodierte Protein exprimiert werden.

#### Spezifische Puffer/Lösungen:

HEBS	137 mM NaCl, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,0), 6 mM Glukose, 5 mM KCl, 0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
------	---

#### 2.2.8.3.2 Kalziumphosphat-Methode

Bei der Kalziumphosphat-Methode werden eine Lösung aus Plasmid-DNS in 0,25 M CaCl<sub>2</sub> und eine 2fache HeBS-Lösung, die Phosphat-Ionen enthält, verwendet. Wird die erste Lösung unter ständigem Rühren zu der 2 fachen HeBS-Lösung getropft, entstehen viele kleine

## Methoden

Kalziumphosphat-Kristalle, in denen DNS-Moleküle eingebettet sind. Diese Kristalle können von den Zellen auf der Zellkultur-Schale aufgenommen werden. Die Plasmid-DNS gelangt anschließend über einen bisher unbekannten Mechanismus in den Zellkern. Das auf der Plasmid-DNS kodierte Protein kann anschließend von den transfizierten Zellen exprimiert werden.

$2,5 \cdot 10^5$  Zellen werden in 2 ml Zellkultur-Nährmedium auf 6 cm-Zellkultur-Schalen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 12 Stunden wird das Nährmedium abgenommen. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und dadurch abgestorbene Zellen entfernt. 4,5 ml Nährmedium werden zugegeben und weitere zwei Stunden inkubiert, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Für die Herstellung des Kalziumphosphat/DNS-Präzipitats werden 500 µl 2fache HeBS-Lösung in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Innerhalb einer Minute werden unter ständigem Rühren 500 µl CaCl<sub>2</sub>/DNS-Lösung zu der 2fachen HeBS-Lösung getropft. Zur vollständigen Bildung der Kalziumphosphat-Kristalle wird diese Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden je 500 µl dieser Lösung einschließlich der Kristalle auf zwei 6 cm-Zellkultur-Schalen mit den zuvor ausgesäten Zellen gleichmäßig verteilt. Die Kristalle werden 20 bis 24 Stunden auf den Zellen belassen. Während dieser Zeit nehmen die Zellen die Kristalle und damit die Plasmid-DNS auf. Die nicht von den Zellen aufgenommenen Kristalle und abgestorbene Zellen werden entfernt, indem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen werden. Die Zellen werden mit 5 ml Nährmedium überschichtet und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

2facher HeBS-Puffer 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
(pH 7,05 mit NaOH)  
CaCl<sub>2</sub>/DNS-Lösung 15 µg Plasmid-DNS, 0,25 M CaCl<sub>2</sub>

### **2.2.9 Analyse der transfizierten Zellen**

#### **2.2.9.1 *In situ* β-Galaktosidase-Untersuchung bei kultivierten Zellen**

Bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen in Zellkultur wird ein Expressionsplasmid in die Zellen eingeschleust. Das auf diesem Plasmid kodierte Protein kann von der Zelle anschließend exprimiert werden. Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, wie viele Zellen transfiziert wurden und das entsprechende Protein exprimieren können.

Zur Bestimmung der Anzahl der ein Protein exprimierenden Zellen kann eine *in situ* β-Galaktosidase-Reaktion verwendet werden. Dabei wird ein Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert, das zur Expression des Enzyms β-Galaktosidase führt (pSV511/β-Galaktosidase).



## Methoden

Die Zellen werden nach der Transfektion durch Zugabe von Formaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Schließlich wird auf diese Zellen das farblose Reagenz X-Gal gegeben. Die durch die Transfektion in den Zellen exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase verwendet X-Gal als Substrat und spaltet es in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indol. Anhand der blauen Färbung der Zellen erkennt man, welche Zellen  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert haben und daher erfolgreich transfiziert wurden.

Die mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmid transfizierten Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen. Es werden 5 ml Fixierlösung zugegeben und 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden, werden 5 ml Permeabilisierungslösung zugegeben und 5 Minuten bei -20°C inkubiert. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, 2,5 ml Färbelösung zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend kann unter dem Mikroskop das Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Zellen bestimmt werden.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

Fixierlösung	1% (v/v) Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungs- lösung	50% (v/v) Methanol (bei -20°C)
Färbelösung	5 mM $K_4Fe(CN)_6$ , 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ , 2 mM $MgCl_2$ , 1 g/l X-Gal in PBS

### 2.2.9.2 Radioaktive metabolische Markierung von eukaryontischen Zellen

Die nach der Synthese von Proteinen in Zellen erfolgenden Prozessierungen können charakterisiert werden. Dazu werden die Zellen zunächst in Nährmedium inkubiert, das die radioaktiven Aminosäuren  $^{35}S$ -Methionin und -Cystein enthält. Alle während dieser Inkubationszeit synthetisierten Proteine werden radioaktiv markiert. Die Prozessierung dieser radioaktiv markierten Proteine können selektiv analysiert werden, wenn die Zellen anschließend in nicht-radioaktivem Nährmedium kultiviert werden und daher keine weitere radioaktive Markierung erfolgt.

Die Zellen auf 6 cm-Zellkultur-Schalen werden 48 Stunden nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml Nährmedium überschichtet, das kein Methionin und Cystein enthält, und 2,5 Stunden bei 37°C und 5%  $CO_2$  inkubiert. Anschließend wird 140  $\mu Ci$   $^{35}S$ -Methionin/Cystein dazu gegeben und 30 Minuten weiter inkubiert. Die Zellen von einer Zellkultur-Schale werden zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und aufgeschlossen (Zeit 0). Die Zellen der anderen Zellkultur-Schalen werden zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen, mit jeweils 2 ml Nährmedium überschichtet und weiter bei 37°C und

## Methoden

---

5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 bzw. 6 Stunden werden die Zellen zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und aufgeschlossen (Zeit 3 bzw. 6).

### 2.2.9.3 Isolierung und Aufschluß von eukaryontischen Zellen

Die Zellen müssen für eine weitere Analyse zunächst von der Zellkultur-Schale abgelöst und isoliert werden. Anschließend können sie mit verschiedenen Methoden aufgeschlossen werden.

Zur Isolierung der auf einer 6 cm-Zellkultur-Schale gewachsenen Zellen werden diese zunächst zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit 750 µl eiskaltem PBS/CLAP überschichtet. Die Zellen werden mechanisch mit einem Zellkratzer vom Schalenboden abgekratzt, wobei darauf zu achten ist, daß sie zu jedem Zeitpunkt mit PBS/CLAP bedeckt sind. Die abgekratzten Zellen werden durch auf- und abpipettieren gegen den Schalenboden vereinzelt und der Überstand nach Zentrifugation (4°C, 530\*g, 2 Minuten) verworfen. Die Zellen werden in 1 ml eiskaltem PBS/CLAP resuspendiert, erneut zentrifugiert (4°C, 730\*g, 2 Minuten) und der Überstand verworfen.

Der Aufschluß der Zellen kann unter nativen oder denaturierenden Bedingungen erfolgen. Beim Aufschluß unter denaturierenden Bedingungen werden die sedimentierten Zellen im Volumenverhältnis von 1 : 1 mit denaturierendem Lysis-Puffer versetzt, gelöst, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit einem 20fachen Volumen an nativem Lysis-Puffer gemischt. Bei einem nativen Aufschluß ohne anschließende Zellfraktionierung werden die Zellen mit einem Überschuß an nativem Lysis-Puffer versetzt und gemischt.

#### Spezifische Puffer/Lösungen:

PBS/CLAP	PBS, 1 * CLAP-Mischung
----------	------------------------

### 2.2.9.4 Zellfraktionierung von eukaryontischen Zellen

Für die Untersuchung, ob ein gegebenes Protein mit zellulären Membranen wechselwirkt oder sich im Zytosol befindet, können eukaryontische Zellen in diese zwei Zell-Bestandteile getrennt werden. Dazu müssen Zellen zunächst unter nativen Bedingungen aufgebrochen werden. Dies kann dadurch erreicht werden, daß die Zellen in einer hypotonischen Lösung suspendiert werden. Durch die geringen Mengen an Salzen in dieser Lösung kommt es zu einem Einstrom von Wasser in die Zellen und einem Anstieg des Zell-Innendrucks, bis die Zellen platzen. Dieses Aufbrechen der Zellen kann dadurch unterstützt werden, daß die aufgeblähten Zellen zusätzlich in einem Zell-Homogenisator durch Scherkräfte aufgerissen werden. Alle Arbeiten werden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Nach der Isolierung der Zellen wird ein Volumen des hypotonischen Puffers zu diesen gegeben, das etwa dem 20fachen Volumen der sedimentierten Zellen entspricht. Die Zellen

## Methoden

werden in diesem Puffer resuspendiert, in einen Zellhomogenisator überführt und 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Der Stößel des Homogenisators wird langsam 20 mal nach oben und unten geführt, der Homogenisator eine Minute auf Eis stehen gelassen und der Stößel weiter 20 mal nach oben und unten geführt. Die Suspension der aufgebrochenen Zellen wird sofort in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in dem zuvor 2,5 M Saccharose in einem Volumen vorgelegt wurde, das 1/10 des Suspensionsvolumens entspricht. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (4°C, 13.800\*g, 5 Minuten), das entstandene Sediment isoliert und in nativen Lysis-Puffer resuspendiert. Es enthält Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen. Der Überstand wird auf ein Saccharose-Kissen geschichtet und zentrifugiert (4°C, 100.000\*g, 30 Minuten). Das Sediment dieser Zentrifugation wird ebenfalls isoliert und in nativem Lysis-Puffer resuspendiert. Dieses Sediment enthält die zellulären Membranen einschließlich der Organellen, die nicht schon nach der ersten Zentrifugation abgetrennt wurden. Der Überstand der Zentrifugation wird auf 100 mM NaCl und 1% (v/v) Triton X-100 eingestellt.

Für die Behandlung der isolierten Membranen werden folgende Bedingungen eingestellt:

- Saponin-Behandlung (Endkonzentration 0,5% (w/v)): 30 Minuten auf Eis
- Carbonat-Behandlung (Endkonzentration 100 mM): 15 Minuten auf Eis
- Triton X-100-Behandlung (Endkonzentration 1% (v/v)): kurz mischen
- SDS-Behandlung (Endkonzentration 0,2% (w/v)): kurz auf RT bringen und mischen
- Proteinase K-Behandlung (Endkonzentration 0,5 g/l): 30 Minuten, auf Eis, anschließend die Reaktion kurz auf RT bringen und dann PMSF (Endkonzentration 2 bis 8 g/l): 30 Minuten, auf Eis

Mit allen erhaltenen Fraktionen wird anschließend eine Immunopräzipitation unter nativen oder denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

hypotonischer Puffer 5 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 \* CLAP-Mischung

#### 2.2.9.5 Infektion von MC57-Zellen mit dem LCM-Virus

Bei der Transfektion von Zellen mit einem Konstrukt, das für ein bestimmtes Protein kodiert, wird zusätzlich zu den zellulären Proteinen nur dieses Protein synthetisiert. Im Gegensatz dazu werden bei der Infektion von Zellen mit einem Virus nicht nur das interessierende Protein, sondern alle für die Virus-Vermehrung erforderlichen Proteine exprimiert.

Die Infektion von Zellen mit LCMV führt abhängig von den verwendeten Bedingungen entweder zu einer akuten oder einer persistenten Infektion. Die adherente Maus-Fibroblasten-Zelllinie MC57 wird bei den hier verwendeten Bedingungen akut mit LCMV infiziert.

Ein Anteil der infizierten Zellen wird für eine FACS-Analyse verwendet, um mit dem monoklonalen Antikörper KL25 (anti-GP-C-Ak) die Expression von GP-1 auf der Zelloberfläche und damit die erfolgreiche Infektion mit LCMV nachzuweisen.

## Methoden

Die Infektion der Zellen und die FACS-Analyse wurden von Rita de Giuli aus dem Labor Groettrup (St. Gallen) und die Immunopräzipitationen von Rita de Giuli und mir parallel durchgeführt. Nach der IP wurden die Proteine von Rita de Giuli in einer SDS-PAGE nach Lämmli und von mir in einer SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow aufgetrennt.

MC57-Zellen werden auf einer Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA behandelt, bis sie sich vom Untergrund der Kulturschale lösen und erneut zweimal mit PBS gewaschen. 10 \* 10<sup>6</sup> Zellen werden in 1 ml Nährmedium ohne FCS für 24 Stunden bei einer Multiplizität der Infektion (moi = multiplicity of infection) von 0,01 mit LCMV infiziert. Dann werden sie wie zuvor von der Kulturschale abgelöst und mit PBS gewaschen. Ein Anteil dieser Zellen wird für eine FACS-Analyse verwendet.

2 \* 10<sup>6</sup> Zellen werden pro Loch in einer 6-Loch-Schale in Nährmedium ausgesät, das kein Methionin und Cystein enthält, und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird auf 1 ml Nährmedium 0,1 mCi <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein gegeben und 60 Minuten weiter inkubiert. Ein Anteil der Zellen wird mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA behandelt, erneut gewaschen und bei -20°C gelagert (Zeit 0). Der andere Anteil der Zellen wird mit PBS gewaschen, Nährmedium mit einem Überschuß an Methionin und Cystein zugegeben und weiter inkubiert. Nach drei bzw. sechs Stunden wird das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA behandelt, erneut gewaschen und bei -20°C gelagert (Zeit 3 bzw. 6). Anschließend erfolgt entweder unter nativen oder denaturierenden Bedingungen ein Aufschluß der Zellen.

Beim nativen Aufschluß werden die Zellen mit 200 µl nativem Lysis-Puffer (Groettrup) bei 4°C behandelt. Beim denaturierenden Aufschluß wird zu den Zellen 10 µl denaturierender Lysis-Puffer gegeben, zwei Minuten bei 95°C inkubiert und 200 µl nativer Lysis-Puffer zugegeben.

Nach dem Aufschluß werden die Lysate zentrifugiert (4°C, 6.000\*g, 12 Minuten) und die Überstände abgenommen. In 5 µl dieser Überstände wird die Radioaktivität bestimmt und jeweils eine Menge verwendet, die einer Radioaktivität von 10<sup>6</sup> Zerfällen pro Minute entspricht. Die jeweiligen Mengen der Überstände werden durch Zugabe von nativem Lysis-Puffer (Groettrup) bzw. nativem Lysis-Puffer auf 200 µl eingestellt. Zu beiden Lysaten werden jeweils 30 µl Protein A-Sepharose-Matrix gegeben und 30 Minuten bei 4°C bewegt. Nach Zentrifugation (4°C, 20.000\*g, 1 Minute) werden die Überstände abgenommen und die Matrix verworfen. Zu jeweils 100 µl der Überstände werden entweder 2 µl des Antikörpers KL25 (1 µg/µl) oder 5 µl anti-SS<sub>7</sub>-Ak gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden 30 µl Protein A-Sepharose-Matrix dazu gegeben und 60 Minuten bei 4°C bewegt. Nach Zentrifugation (4°C, 20.000\*g, 2 Minuten) wird der Überstand abgenommen und die Matrix gewaschen.

Bei der nativen Immunopräzipitation wird die Matrix dreimal mit je 1 ml Puffer NET-TON gewaschen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend zusätzlich dreimal mit jeweils 1 ml Puffer NET-T gewaschen.

## Methoden

Bei der denaturierenden Immunopräzipitation wird die Matrix jeweils zweimal mit 1,25 ml IP-Waschpuffer A, B und C gewaschen.

Die Matrix wird in Lämmli- bzw. Schägger/von Jagow-Probenpuffer 5 Minuten bei 95°C inkubiert und die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli (5%iges Trenngel) bzw. nach Schägger/von Jagow aufgetrennt.

### Spezifische Puffer/Lösungen:

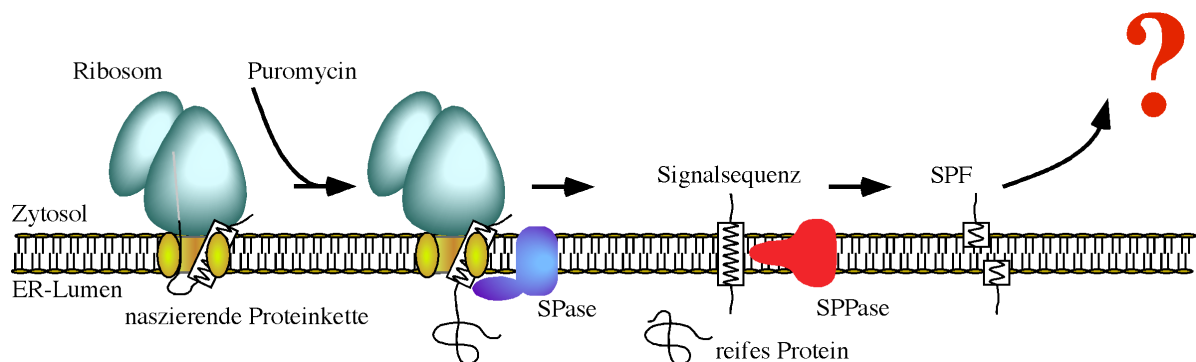
NET-T	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,05% NaN <sub>3</sub>
NET-TON	650 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,05% NaN <sub>3</sub> , 1 mg/ml Ovalbumin
nativer Lysis-Puffer (Groettrup)	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,85 mM PMSF, 10 µM Leupeptin, 2,8 µM Pepstatin, 0,75 µM Aprotinin, 2% Nonidet P40
Lysis-Puffer (nativ)	100 mM NaCl, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,3), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% (v/v) Triton X-100, 1 * CLAP-Mischung, 100 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)
Lysis-Puffer (denaturierend)	100 mM NaCl, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,3), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% (w/v) SDS, 1 * CLAP-Mischung, 100 µg/ml PMSF (frisch zugegeben)
Waschpuffer A	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,4% (v/v) Triton X-100
Waschpuffer B	500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,2% (v/v) NP-40
Waschpuffer C	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C *in vitro*

Das Glykoprotein pGP-C des LCMV wird nach einer akuten Infektion einer Wirtszelle auf seinem Transport zur Plasmamembran zunächst in die ER-Membran inseriert und N-glykosyliert. Es wurde postuliert, daß die ersten 58 Aminosäuren des pGP-C eine SS darstellen, die während oder nach der Translokation des Proteins abgespalten wird. In einem *in vitro* Translations-/Translokationssystem sollte die Abspaltung und das Schicksal dieser SS untersucht werden.

#### 3.1.1 Überblick über das verwendete *in vitro* System



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Puromycin-induzierten Abspaltung der Signalsequenz**

In Anwesenheit von Rauhen Mikrosomen (RM) werden die von den Ribosomen synthetisierten naszierenden Polypeptidketten teilweise durch die Membran der RM transloziert. Dieser Zustand ist stabil, da die verwendete mRNA kein Stop-Kodon besitzt und daher die naszierenden Polypeptidketten nicht von den Ribosomen entlassen werden können. Erst durch Behandlung mit Puromycin werden die Polypeptidketten synchron von den Ribosomen entlassen und vollständig transloziert. Die N-terminalen Signalsequenzen können durch den Signalpeptidase-Komplex (SPase) von den Pre-Proteinen abgespalten werden. Anschließend können die abgespalteten Signalsequenzen durch eine Signalpeptidpeptidase (SPPase) prozessiert und die dadurch entstandenen Signalpeptidfragmente (SPF) aus der Membran entlassen werden.

Bei diesem *in vitro* System wird eine mRNA verwendet, die für ein verkürztes Protein kodiert und kein Stop-Kodon besitzt. Für die Herstellung einer solchen mRNA wird eine entsprechende cDNS, die für das gesamte Protein kodiert, zunächst durch ein Restriktionsenzym innerhalb der kodierenden Region geschnitten. Nach deren *in vitro* Transkription entsteht die mRNA ohne Stop-Kodon. Bei ihrer Translation in Anwesenheit von RM werden die naszierenden Polypeptidketten aufgrund des fehlenden Stop-Kodons nicht von den Ribosomen entlassen. Da die Spaltungsstelle für die Signalpeptidase (SPase) bei den entstehenden Translokationsintermediaten nicht zugänglich ist, erfolgt auch keine SS-

## Ergebnisse

Abspaltung. Die naszierenden Polypeptidketten werden durch Behandlung mit Puromycin synchronisiert von den Ribosomen entlassen. Dadurch werden die Proteine über die RM-Membran transloziert. Die SS können abgespaltet sowie durch eine Signalpeptidpeptidase (SPPase) weiter prozessiert werden (Abb. 5).

Ein verkürztes Prolaktin (pPL), welches die ersten 86 Aminosäuren des Wildtyp-Proteins umfaßt (pPL<sub>86</sub>), wurde in einer früheren Arbeit verwendet, um die Abspaltung der SS des pPL in diesem *in vitro* System zu untersuchen (Lyko *et al.*, 1995).

Um die Abspaltung der SS von pGP-C zu untersuchen, wurde dasselbe *in vitro* System verwendet und eine ähnliche Strategie verfolgt. In einigen Experimenten wurden die naszierenden Polypeptidketten nach der Translation in Anwesenheit von RM durch Puromycin-Behandlung von den Ribosomen entlassen und die mit den RM assoziierten Proteine nach Ultrazentrifugation von den löslichen, zytoplasmatischen Proteinen getrennt. Durch eine anschließende Proteinase K-Behandlung können die translozierten von den nicht-translozierten Proteinen unterschieden werden. Dabei sollten die auf der zytoplasmatischen Seite der Membranen exponierten Proteinanteile von Proteinase K abgebaut werden, während die über die Membranen translozierten Proteinsequenzen vor diesem Verdau geschützt sind. Wenn die Membranen zunächst durch Triton X-100-Behandlung aufgelöst werden, sollten alle Proteine vollständig durch Proteinase K abgebaut werden. In einer SDS-PAGE können die Proteine schließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

### 3.1.2 Überblick über die im *in vitro* System verwendeten Konstrukte

Die Länge eines verkürzten pGP-C wurde so gewählt, daß eine Abspaltung der SS wahrscheinlich erst nach Freisetzung der naszierenden Polypeptidkette von den Ribosomen erfolgt. Daher wurde das pGP-C<sub>142</sub> verwendet (Abb. 6). Ein pGP-C<sub>142</sub> mit einer C-terminalen HA-Markierung (pGP-C<sub>142</sub>-HA) wurde hergestellt, um sowohl das Pre-Protein als auch das reife Protein nach erfolgter SS-Abspaltung unter Verwendung eines anti-HA-Ak nachzuweisen (Abb. 6).

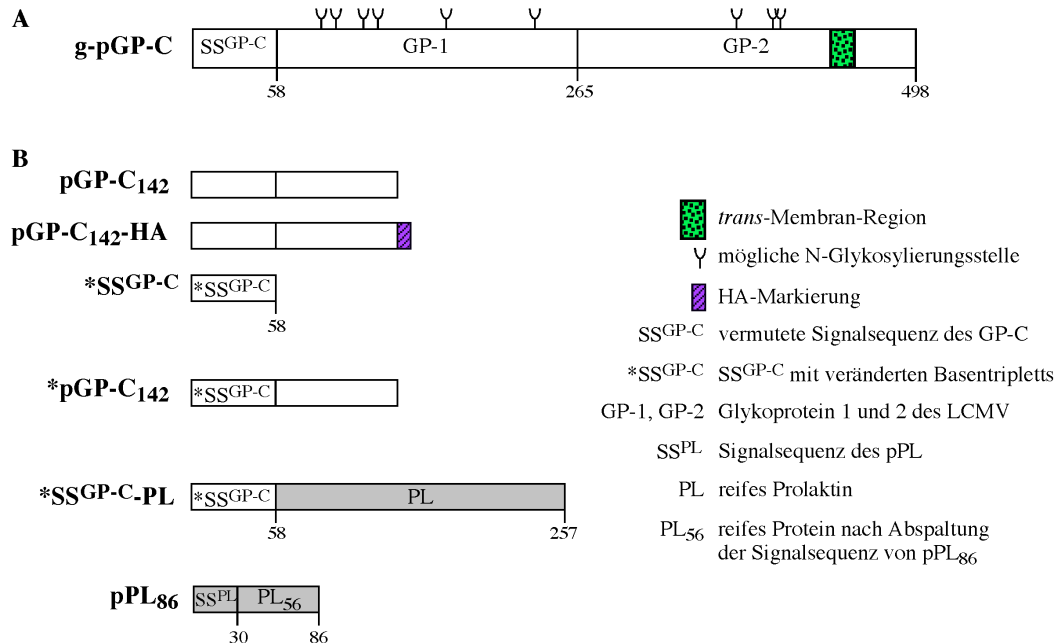
In einer anderen Arbeit war gefunden worden, daß eine Veränderung der Basentriplets zu solchen, die bei hoch exprimierten menschlichen Genen sehr häufig vorkommen, eine Steigerung der Translationsrate in menschlichen Zellen bewirken kann (Haas *et al.*, 1996). Die in der genomischen RNS von LCMV verwendeten Basentriplets entsprechen nicht diesen bevorzugten Sequenzen. Zunächst wurde eine cDNS mit den bevorzugten Basentriplets hergestellt, die für die ersten 58 Aminosäuren des pGP-C kodieren (\*SS<sup>GPC</sup>). Um eine hohe Translationsrate zu erreichen, wurde daraus das Konstrukt \*pGP-C<sub>142</sub> hergestellt. Bei diesem Konstrukt sind die Basentriplets der SS verändert, während der C-terminale Anteil des Proteins von unveränderten Basentriplets kodiert wird. Zusätzlich wurde das Protein \*SS<sup>GPC</sup> translatiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt, um dort die Position der abgespalteten SS präzise zu bestimmen.

Die Effizienz der Abspaltung einer SS vom Pre-Protein ist nicht nur von der SS, sondern auch von den N-terminalen Aminosäuren des reifen Proteinanteils abhängig. Daher wurde eine

## Ergebnisse

cDNS hergestellt, die für ein Fusionsprotein aus der SS des pGP-C mit den veränderten Basentriplets (\*SS<sup>GP-C</sup>) und dem reifen Prolaktin (PL) kodiert (\*SS<sup>GP-C</sup>-PL).

Als Kontrolle für die Translokation und die SS-Abspaltung wurde das verkürzte pPL verwendet (pPL<sub>86</sub>).



**Abb. 6 Schematische Darstellung der im *in vitro* System verwendeten Konstrukte**

A.) Die Vorstufe des LCMV-Glykoproteins mit den möglichen N-Glykosylierungsstellen (g-pGP-C)

B.) Die *in vitro* translatierten Proteine und Proteinfragmente

### 3.1.3 Translation und Translokation von pPL<sub>86</sub> und GP-C<sub>142</sub>

Die einzelnen cDNS wurden *in vitro* transkribiert und die resultierenden mRNS in den Translations-/Translokationsreaktionen eingesetzt. Die Konzentrationen an mRNS, Salzen, RM und SRP wurden in Vorexperimenten für die Translation/Translokation des pGP-C<sub>142</sub> optimiert und sowohl für das pGP-C<sub>142</sub> als auch das \*SS<sup>GP-C</sup>-PL verwendet. Bei der Translation/Translokation des pPL<sub>86</sub> wurden die in früheren Experimenten für das pPL<sub>86</sub> ermittelten optimalen Konzentrationen eingestellt (Lyko *et al.*, 1995).

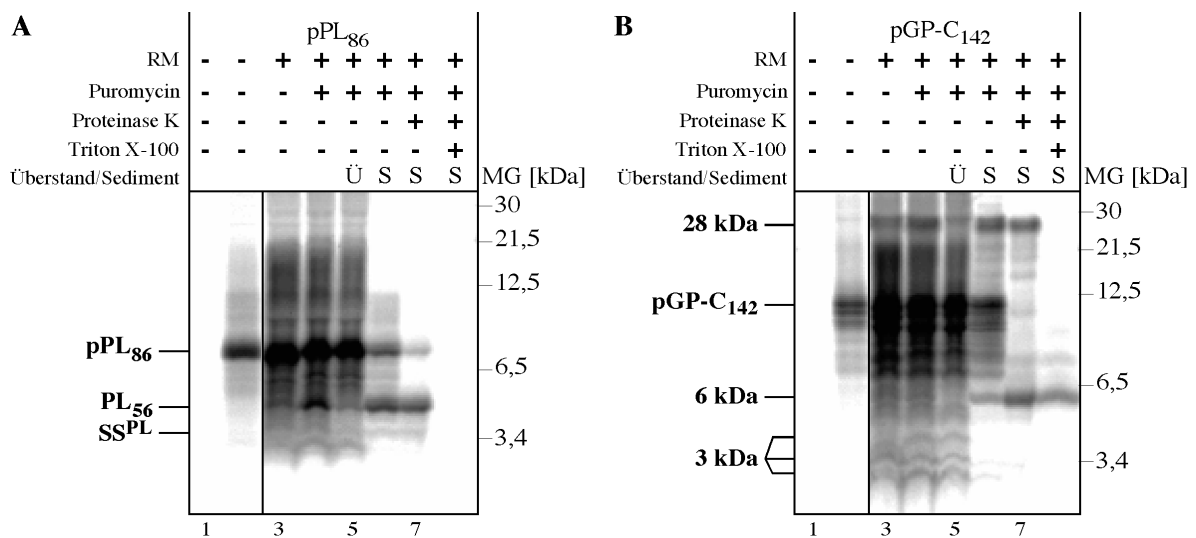
Bei der Translation der mRNS des pPL<sub>86</sub> wird in Ab- und Anwesenheit von RM hauptsächlich ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 9 kDa synthetisiert (Abb. 7 A: Spuren 2 und 3). Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht des pPL<sub>86</sub> von 9,5 kDa. Ohne den Zusatz von mRNS wird im Gegensatz dazu kein Protein translatiert (Spur 1). Nach Puromycin-Behandlung ist ein zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 6 kDa erkennbar, das vermutlich dem translozierten Protein PL<sub>56</sub> nach Abspaltung der SS entspricht (Spur 4). Nach Ultrazentrifugation befindet sich das pPL<sub>86</sub> hauptsächlich im Überstand (Spur 5), während das PL<sub>56</sub> nahezu ausschließlich im Sediment vorliegt (Spur 6). Zusätzlich ist im Sediment eine schwache Protein-Bande bei einem Molekulargewicht von



## Ergebnisse

etwa 4 kDa erkennbar, die wahrscheinlich der abgespalteten SS ( $SS^{PL}$ ) entspricht. Durch Proteinase K wird das  $pPL_{86}$  im Sediment fast vollständig abgebaut (Spur 7). Im Gegensatz dazu sind das  $PL_{56}$  und die  $SS^{PL}$  vor dem Protease-Verdau geschützt. Dieser Schutz beruht auf der intakten RM-Membran, da nach Auflösung der Membranen durch Triton X-100 sämtliche Proteine einschließlich des  $PL_{56}$  und der  $SS^{PL}$  durch die Proteinase K vollständig abgebaut werden (Spur 8).

Die Mengen von  $pPL_{86}$ ,  $PL_{56}$  und  $SS^{PL}$  nach Proteinase K-Behandlung der Sedimente wurden quantifiziert. Daraus kann berechnet werden, daß von mehr als 80% des translozierten  $pPL_{86}$  die SS abgespaltet wird.



**Abb. 7 In vitro Translation/Translokation von  $pPL_{86}$  und GP-C<sub>142</sub>**

Eine *in vitro* Translations-/Translokationsreaktion in Ab- (1) oder Anwesenheit (2 bis 8) von mRNA wurde durchgeführt. mRNS, die für  $pPL_{86}$  (A) bzw.  $pGP-C_{142}$  (B) kodieren, wurden in Ab- oder Anwesenheit von Rauhen Mikrosomen (RM) translatiert. Die Proben der Spuren 4 bis 8 wurde mit Puromycin behandelt. Anschließend wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt und der Überstand (Ü) vom Sediment (S) getrennt. Ein Teil des resuspendierten Sedimentes wurde mit Proteinase K bzw. Proteinase K/Triton X-100 behandelt. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE nach Schagger/von Jagow aufgetrennt.

Im Vergleich zu den Spuren 1 und 2 wurde in den Spuren 3 bis 8 eine zehnmal höhere Proben-Menge aufgetragen.

Nach der Translation der mRNA des  $pGP-C_{142}$  in Ab- und Anwesenheit von RM ist hauptsächlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa erkennbar (Abb. 7 B: Spuren 2 und 3). Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich um das  $pGP-C_{142}$  mit einem errechneten Molekulargewicht von 15,6 kDa, da kein Protein entsteht, wenn keine mRNA zugegeben wird (Spur 1). Neben dem  $pGP-C_{142}$  wird eine große Menge von Proteinen mit geringerem Molekulargewicht synthetisiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Proteinfragmente nach vorzeitigen Translationsabbrüchen handelt. Die Behandlung mit Puromycin führt zu keiner sichtbaren Veränderung des  $pGP-C_{142}$ . Zusätzlich treten schwache Protein-Banden auf, die Proteinen mit Molekulargewichten um etwa 3 kDa entsprechen (Spur 4). Nach Ultrazentrifugation ist das  $pGP-C_{142}$  überwiegend im Überstand (Spur 5), aber auch im Sediment vorhanden (Spur 6). Ausschließlich im Sediment befinden sich Proteine mit

## Ergebnisse

Molekulargewichten von etwa 6 und 28 kDa. Durch Proteinase K wird das pGP-C<sub>142</sub> im Sediment fast vollständig, das 28 kDa-Protein aber nicht abgebaut (Spur 7). Die Menge des 6 kDa-Proteins wird durch diese Protease-Behandlung stark erhöht. Nach Auflösung der Membranen durch Triton X-100 werden sowohl das 28 kDa-Protein als auch das pGP-C<sub>142</sub> vollständig von Proteinase K abgebaut (Spur 8). Die Resistenz dieser Proteine gegenüber Proteinase K-Verdau in Abwesenheit von Triton X-100 beruht also auf dem Schutz durch die Membranen. Das 6 kDa-Protein wird nach Auflösung der Membranen im Gegensatz dazu nur zum Teil durch Proteinase K verdaut.

Aufgrund des Molekulargewichtes könnte es sich bei dem 28 kDa-Protein um ein vollständig N-glykosyliertes pGP-C<sub>142</sub> (g-pGP-C<sub>142</sub>) handeln, das ein errechnetes Molekulargewicht von 27,6 kDa besitzt. Das 6 kDa-Protein könnte die abgespaltete SS des pGP-C<sub>142</sub> sein, die ein errechnetes Molekulargewicht von 6,4 kDa besitzt (SS<sup>GP-C</sup>).

Die Menge eines translatierten \*pGP-C<sub>142</sub> ist im Vergleich zum pGP-C<sub>142</sub> lediglich um etwa 10% größer (nicht gezeigt). Daher wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich dasjenige pGP-C<sub>142</sub> mit den unveränderten Basentriplets verwendet.

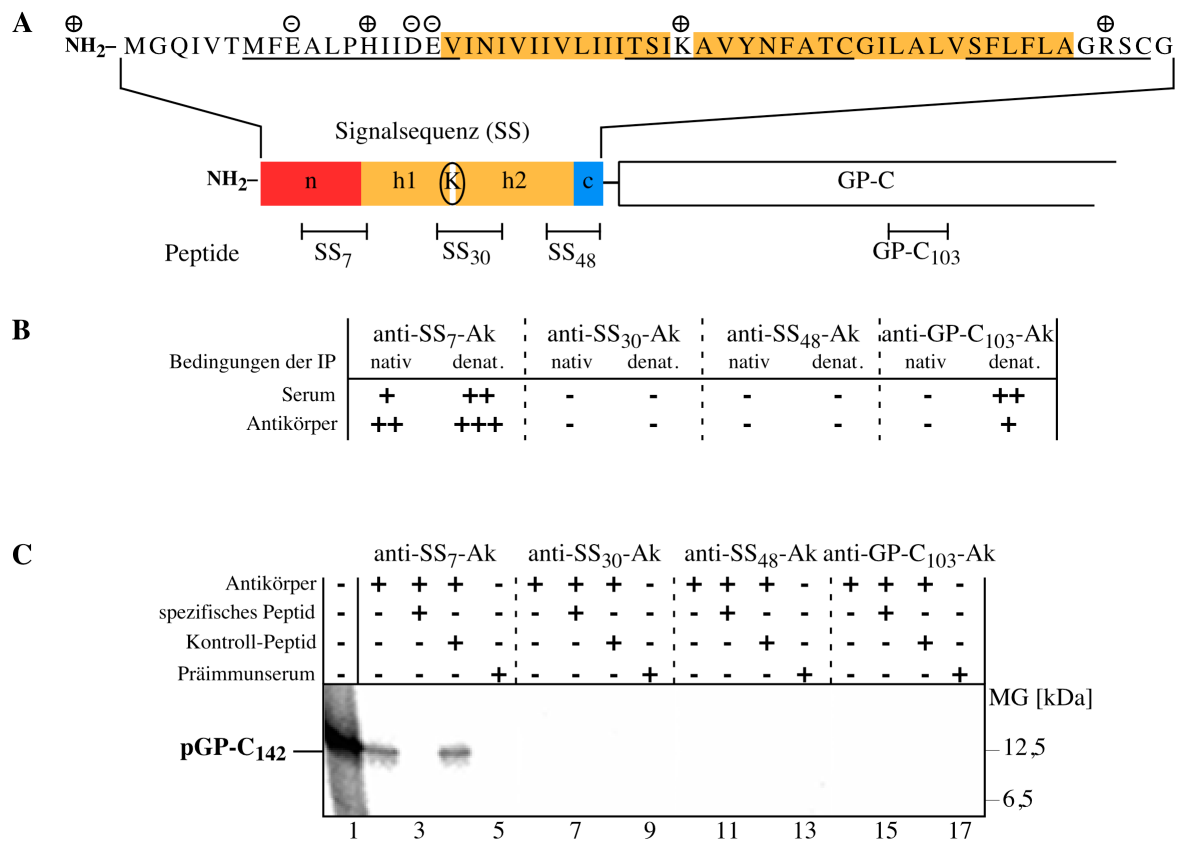
Bei der Verwendung des Weizenkeim-Extraktes an Stelle des Retikulozyten-Lysats wird weder die Menge der Translationsfragmente verringert noch die Menge des 6 kDa-Proteins erhöht (nicht gezeigt). Daher wurden alle weiteren *in vitro* Experimente ausschließlich im *in vitro* System mit Weizenkeim-Extrakt durchgeführt.

### 3.1.4 Charakterisierung von anti-Peptid-Antikörpern

Anti-Peptid-Antikörper sollten hergestellt werden, um das reife GP-C und dessen abgespaltete SS identifizieren zu können. Peptide, die verschiedenen Bereichen der Signalsequenz und des reifen Proteins entsprechen, wurden synthetisiert (Abb. 8 A) und an KLH gekoppelt. Kaninchen wurden mit diesen KLH-gekoppelten Peptiden immunisiert und die anschließend erhaltenen Seren teilweise zur Isolierung der entstandenen Antikörper benutzt. Dazu wurde eine Affinitätschromatographie unter Verwendung der entsprechenden Peptide durchgeführt. Sowohl die Seren als auch die isolierten Antikörper wurden dahingehend getestet, ob sie das *in vitro* translatierte pGP-C<sub>142</sub> in Immunopräzipitationen unter nativen und denaturierenden Bedingungen präzipitieren (Abb. 8 B).

Für die Untersuchung der Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung wurde zur IP entweder kein Peptid, ein Kontroll-Peptid oder das Peptid zugegeben, das zur jeweiligen Immunisierung verwendet worden war (spezifisches Peptid) (Abb. 8 C).

## Ergebnisse



**Abb. 8 Charakterisierung von anti-Peptid-Antikörpern**

A.) Überblick über die vermutete Signalsequenz des pGP-C<sub>142</sub> und die synthetisierten Peptide, die für die Herstellung der anti-Peptid-Ak verwendet wurden

Die Ladungen der Aminosäuren wurden angegeben und die in den synthetisierten Peptiden vorkommenden Aminosäuren unterstrichen. Die grau unterlegten Bereiche wurden als zwei h-Regionen definiert (h1 und h2), die überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen und keine geladenen Aminosäuren enthalten. Sie werden durch eine geladene Aminosäure (K) getrennt.

B.) Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunopräzipitationen des *in vitro* translatierten pGP-C<sub>142</sub> mit Seren und isolierten Antikörpern unter nativen und denaturierenden Bedingungen

C.) Spezifität der Immunopräzipitation von pGP-C<sub>142</sub> mit den vier hergestellten Antikörpern

Die pGP-C<sub>142</sub> mRNA wurde *in vitro* translatiert und anschließend eine Immunopräzipitation (IP) mit affinitätsgereinigten anti-Peptid-Antikörpern unter nativen Bedingungen durchgeführt. Zur IP wurde entweder kein Peptid, ein Kontroll-Peptid oder das spezifische Peptid gegeben, das zur Herstellung des anti-Peptid-Ak verwendet worden war. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

Das Serum der Kaninchen, die mit dem KLH-gekoppelten Peptid SS<sub>7</sub> immunisiert worden waren, präzipitiert das *in vitro* translatierte pGP-C<sub>142</sub> sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen, während das mit dem Peptid GP-C<sub>103</sub> erhaltene Serum nur unter denaturierenden Bedingungen das pGP-C<sub>142</sub> erkennt (Abb. 8 B). Im Gegensatz dazu erfolgt unter beiden Bedingungen keine Immunopräzipitation, wenn die mit den Peptiden SS<sub>30</sub> oder SS<sub>48</sub> erhaltenen Seren verwendet werden.

Wird die IP unter nativen Bedingungen mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak durchgeführt und entweder kein Peptid (Abb. 8 C: Spur 2) oder das Kontroll-Peptid (Spur 4) zugegeben, kann ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa präzipitiert werden, das dem translatierten

## Ergebnisse

---

pGP-C<sub>142</sub> entspricht (Spur 1). Das pGP-C<sub>142</sub> ist hingegen in Anwesenheit des spezifischen Peptids während der IP nicht erkennbar (Spur 3). Ebenso präzipitiert das Präimmunserum pGP-C<sub>142</sub> nicht (Spur 5). Es handelt sich also um eine spezifische Bindung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak an sein Epitop. Keiner der anderen isolierten anti-Peptid-Ak kann unter den verwendeten nativen Bedingungen das pGP-C<sub>142</sub> präzipitieren (Spuren 6 bis 17).

### 3.1.5 Identifizierung und Charakterisierung der von pGP-C<sub>142</sub> abgespalteten Signalsequenz

Ein Hinweis auf die Abspaltung der SS konnte bisher nur durch die Bildung eines 6 kDa-Proteins gefunden werden (vgl. Abb. 7 B). Daher sollte das 6 kDa-Protein unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak durch eine IP unter denaturierenden Bedingungen identifiziert und charakterisiert werden.

Ein Größenstandard bestehend aus der vermuteten Signalsequenz des pGP-C<sub>142</sub> mit den veränderten Basentriplets (\*SS<sup>GPC</sup>) wurde translatiert und unter denaturierenden Bedingungen mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak immunpräzipitiert.

Die mRNS des pGP-C<sub>142</sub> wurde in Anwesenheit von RM translatiert und der Überstand vom Sediment durch Ultrazentrifugation getrennt. Im Überstand sind das pGP-C<sub>142</sub>-Protein und niedermolekulare Proteinfragmente zu erkennen (Abb. 9: Spur 1). Durch Proteinase K werden alle Proteine im Überstand bis auf ein 6 kDa-Protein abgebaut (Spur 2). Daraus läßt sich schließen, daß das pGP-C<sub>142</sub> durch die aktive Proteinase K zu einem 6 kDa-Protein abgebaut wird.

Im Sediment sind die Membran-assoziierten Proteine pGP-C<sub>142</sub>, ein 28 kDa-Protein und Proteine mit Molekulargewichten um etwa 3 kDa zu erkennen (Spur 3). Außerdem ist ein 6 kDa-Protein im Sediment vorhanden, welches im unbehandelten Überstand nicht erkennbar ist. Durch Behandlung des Sedimentes mit Proteinase K wird der größte Anteil des pGP-C<sub>142</sub> abgebaut und die Menge des 6 kDa-Proteins stark erhöht (Spur 4). Die Menge des 28 kDa-Proteins bleibt unverändert. Durch Proteinase K werden in Anwesenheit von Triton X-100 bis auf das 6 kDa-Protein alle Proteine im Sediment abgebaut (Spur 5). Das 6 kDa-Protein ist also auch ohne intakte Membranen gegenüber Proteinase K-Verdau geschützt. Im Gegensatz dazu sind das 28 kDa-Protein und ein kleiner Anteil des pGP-C<sub>142</sub> nur in Abwesenheit von Triton X-100 durch die intakten Membranen vor Proteinase K-Verdau geschützt und werden daher transloziert.

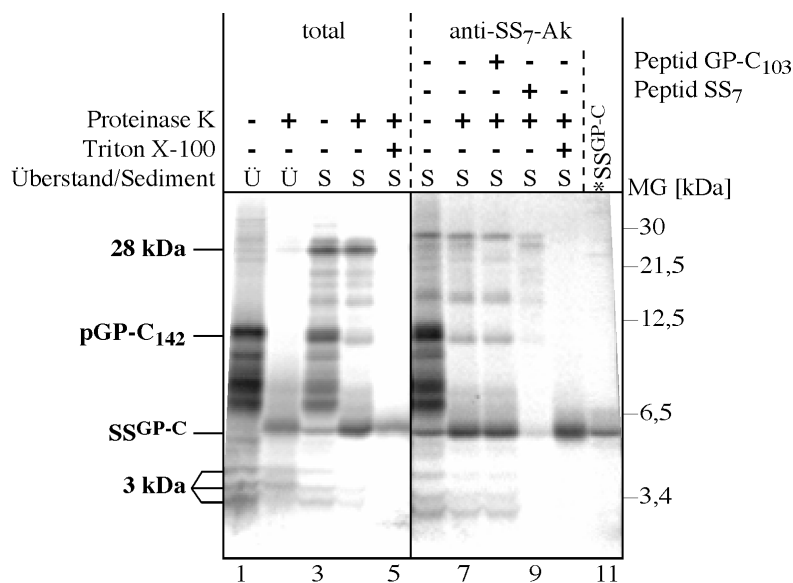
Unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak wurden Immunpräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen mit den Sedimenten nach verschiedenen Behandlungen durchgeführt, um die synthetisierten Proteine und die durch Proteolyse entstandenen Fragmente zu charakterisieren. Der anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert im unbehandelten Sediment das pGP-C<sub>142</sub>, das 28 kDa-Protein, das 6 kDa-Protein und Proteine mit Molekulargewichten um 3 kDa (Spur 6). Nach Proteinase K-Behandlung werden diese Proteine dennoch vom Antikörper erkannt (Spur 7). Die präzipitierte Menge der Proteine einschließlich der zusätzlich durch Proteinase K-Verdau

## Ergebnisse

entstandenen Menge des 6 kDa-Proteins ändert sich nicht, wenn das Peptid GP-C<sub>103</sub> zugegeben wird (Spur 8). Im Gegensatz dazu verhindert die Zugabe des Peptids SS<sub>7</sub> die Immunopräzipitation aller Proteine nahezu vollständig (Spur 9). Dies zeigt, daß diese Proteine spezifisch präzipitiert werden und daher den N-terminalen Teil der SS<sup>GPC</sup> tragen.

Nach Zusatz von Triton X-100 zum Protease-Verdau wird lediglich das 6 kDa-Protein präzipitiert (Spur 10). Das Molekulargewicht des 6 kDa-Proteins ändert sich durch diese Behandlungen nicht, da sich das 6 kDa-Protein nach der SDS-PAGE auf der Höhe der *in vitro* translatierten und mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitierten \*SS<sup>GPC</sup> befindet (Spur 11).

Daher handelt es sich bei dem im Sediment entstandenen 6 kDa-Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um die abgespaltete vollständige SS des pGP-C (SS<sup>GPC</sup>). Die zusätzlich entstandene Protein-Menge nach Proteinase K-Behandlung zeigt, daß dasselbe Protein auch durch den unvollständigen Abbau von pGP-C<sub>142</sub> entstehen kann.



**Abb. 9 Identifizierung und Charakterisierung der von pGP-C<sub>142</sub> abgespalteten Signalsequenz**

Die pGP-C<sub>142</sub> mRNA wurde in Anwesenheit von RM translatiert. Nach Puromycin-Behandlung wurde der Überstand (Ü) vom Sediment (S) mittels Ultrazentrifugation getrennt und ein Teil der Proben mit Proteinase K- bzw. Proteinase K/Triton X-100 behandelt. Eine IP unter denaturierenden Bedingungen wurde mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak durchgeführt. Zu der IP wurde entweder kein Peptid, das Kontroll-Peptid GP-C<sub>103</sub> oder das spezifische Peptid SS<sub>7</sub> gegeben. Als Größenstandard diente das \*SS<sup>GPC</sup>, welches *in vitro* translatiert und ebenfalls mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert wurde. Die Proteine wurden entweder direkt (total) oder nach der IP (anti-SS<sub>7</sub>-Ak) in einer SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow aufgetrennt.

Es wurde bestimmt, welcher Anteil des Membran-assoziierten pGP-C<sub>142</sub> transloziert wird. Membran-assoziierte Proteine befinden sich nach der Trennung vom Überstand im unbehandelten Sediment (Spur 3), während die translozierten Proteine trotz Proteinase K-Behandlung im Sediment zu erkennen sind (Spur 4). Da eine mögliche N-Glykosylierung des pGP-C<sub>142</sub> zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes führen würde, wurden neben dem pGP-C<sub>142</sub> zusätzlich alle Proteine mit höheren Molekulargewichten berücksichtigt. Daher

## Ergebnisse

wurden die Protein-Mengen von Membran-assoziierten (Spur 3) und translozierten Proteinen (Spur 4) mit Molekulargewichten von mehr als etwa 12 kDa quantifiziert. Aus dem Verhältnis dieser beiden Protein-Mengen kann berechnet werden, daß etwa 55% der Membran-assoziierten Proteine transloziert werden.

Zusätzlich wurde bestimmt, aus welchem Anteil des translozierten und vielleicht N-glykosylierten pGP-C<sub>142</sub> die SS<sup>GPC</sup> abgespaltet wird. Da durch Proteinase K-Behandlung der Sedimente die Menge des SS<sup>GPC</sup> stark ansteigt, wurde die Menge der SS<sup>GPC</sup> in den unbehandelten Sedimenten quantifiziert (Spur 3). Aus dem Verhältnis der Mengen der translozierten Proteine mit Molekulargewichten von mehr als etwa 12 kDa (Spur 4) und der SS<sup>GPC</sup> (Spur 3) ergibt sich, daß aus weniger als etwa 40% dieser translozierten Proteine das 6 kDa-Protein freigesetzt wird.

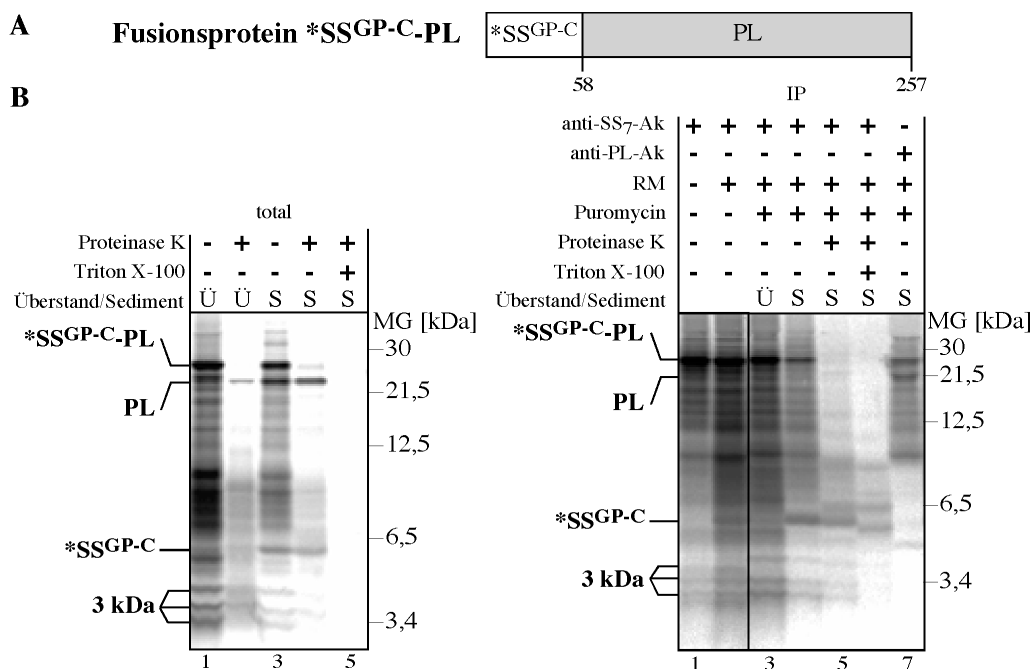
### 3.1.6 Translokation und Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C von einem Fusionsprotein

Die Menge der von pGP-C<sub>142</sub> abgespalteten SS<sup>GPC</sup> während der *in vitro* Translokationsreaktion ist sehr gering. Die Effizienz einer SS-Abspaltung wird nicht nur von der SS sondern auch von den N-terminalen Aminosäuren des reifen Pre-Protein-Anteils bestimmt. Durch molekulare Klonierung wurde ein Fusionsprotein der SS des pGP-C mit den veränderten Basentriplets (\*SS<sup>GPC</sup>) mit Prolaktin (PL) hergestellt, um einen möglichen Einfluß des reifen Anteils des Pre-Proteins auf die Abspaltung der SS zu untersuchen (Abb. 10 A).

Die mRNA für das Fusionsprotein \*SS<sup>GPC</sup>-PL wurde *in vitro* in Anwesenheit von RM translatiert und anschließend der Überstand vom Sediment durch Ultrazentrifugation getrennt. Der Überstand enthält unter anderem ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa, das dem errechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins (\*SS<sup>GPC</sup>-PL) von 28,3 kDa entspricht (Abb. 10 B total: Spur 1). Zusätzlich können einige Proteine mit Molekulargewichten um 3 kDa erkannt werden. Durch Zugabe von Proteinase K werden alle Proteine fast vollständig abgebaut (Spur 2).

Im Sediment befinden sich hauptsächlich Proteine mit Molekulargewichten von etwa 28, 22 und 6 kDa, die dem Fusionsprotein \*SS<sup>GPC</sup>-PL (28,3 kDa), dem reifen PL (22 kDa) und der abgespalteten Signalsequenz \*SS<sup>GPC</sup> (6,4 kDa) entsprechen könnten (Spur 3).

Durch Proteinase K werden das 22 und das 6 kDa-Protein im Sediment nicht abgebaut (Spur 4). Nach Auflösung der Membranen durch Zugabe von Triton X-100 und Proteinase K werden alle zuvor vorhandenen Proteine einschließlich des 6 kDa-Proteins abgebaut (Spur 5). Sowohl das 22 kDa- als auch das 6 kDa-Protein sind daher durch die RM-Membran vor der Proteinase K geschützt.



**Abb. 10 Translokation und Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C von einem Fusionsprotein**

A.) Schematische Darstellung des Fusionsproteins \*SS<sup>GPC</sup>-PL

B.) Die \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>-PL mRNA wurde *in vitro* in Ab- oder Anwesenheit von RM translatiert. Die Proben 1 bis 5 (total) und 3 bis 7 (IP) wurden mit Puromycin behandelt und der Überstand (Ü) vom Sediment (S) getrennt. Ein Teil des resuspendierten Sedimentes wurde mit Proteinase K bzw. Proteinase K/Triton X-100 behandelt. Die Proteine der Proben wurden entweder direkt (total) oder nach Immunopräzipitation (IP) mit dem anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-PL-Ak in einer SDS-PAGE nach Schagger/von Jagow aufgetrennt.

Bei der IP wurden im Vergleich zu den Spuren 1 und 2 in den Spuren 3 bis 6 eine zweifach höhere Menge der Proben verwendet und aufgetragen.

Der anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von RM das \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>-PL, während das 6 kDa-Protein und Proteine mit Molekulargewichten um etwa 3 kDa nur in Anwesenheit von RM erkannt werden (Abb. 10 B IP: Spuren 1 und 2). Nach der Trennung von Überstand und Sediment sind sowohl \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>-PL als auch das 6 kDa-Protein im Sediment zu erkennen (Spur 4). Ein 22 kDa-Protein wird im Sediment hingegen nicht vom Antikörper präzipitiert. Durch Proteinase K wird das \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>-PL im Sediment vollständig abgebaut (Spur 5). Im Gegensatz dazu wird das 6 kDa-Protein auch unter diesen Bedingungen präzipitiert. Wenn die Membranen vor der Behandlung mit Proteinase K aufgelöst werden, kann der anti-SS<sub>7</sub>-Ak eine geringe Menge eines Proteins erkennen, dessen Molekulargewicht unter dem des 6 kDa-Proteins liegt (Spur 6). Dabei könnte es sich um das 6 kDa-Protein handeln, dessen C-terminaler Teil von der Protease abgebaut sein könnte. Wenn für die IP der anti-PL-Ak verwendet wird, kann im unbehandelten Sediment sowohl \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>-PL als auch das 22 kDa-Protein, aber nicht das 6 kDa-Protein präzipitiert werden (Spur 7). Bei dem 22 kDa-Protein handelt es sich demnach um das reife PL nach der Abspaltung der Signalsequenz \*SS<sup>G<sup>P</sup>C</sup>, welche dem 6 kDa-Protein entspricht.

## Ergebnisse

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, daß auch das Fusionsprotein \*SS<sup>GPC</sup>-PL nur mit einer geringen Effizienz über die RM-Membran transloziert und die Signalsequenz \*SS<sup>GPC</sup> abgespaltet wird.

### 3.1.7 Charakterisierung der Translokation des pGP-C<sub>142</sub>-HA

Die Abspaltung der SS durch die Signalpeptidase erfolgt nur, wenn das Pre-Protein über die Membran transloziert oder in die Membran inseriert wird. Das pGP-C<sub>142</sub> besitzt vier mögliche N-Glykosylierungsstellen, wobei das vollständig N-glykosylierte pGP-C<sub>142</sub> ein errechnetes Molekulargewicht von 27,6 kDa besitzt (Abb. 11 A). Daher sollte untersucht werden, ob das 28 kDa-Protein das vollständig N-glykosylierte pGP-C<sub>142</sub> darstellt. Dazu wurde das Akzeptor-Tripeptid Benzoyl-N-L-T-amid verwendet, das die N-Glykosylierung eines translozierenden Glykoproteins hemmt. Zur Identifizierung des N-glykosylierten Proteins wurde das pGP-C<sub>142</sub>-Protein mit einer C-terminalen HA-Markierung verwendet (pGP-C<sub>142</sub>-HA), welches mit einem anti-HA-Ak präzipitiert werden sollte.

Die mRNS des pGP-C<sub>142</sub>-HA-Proteins wurde *in vitro* in Anwesenheit von RM translatiert und anschließend der Überstand vom Sediment durch Ultrazentrifugation getrennt. Das pGP-C<sub>142</sub>-HA mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa befindet sich überwiegend im Überstand, aber auch im Sediment (Abb. 11 B: Spuren 1 und 2). Im Sediment befinden sich zusätzlich höher-molekulare Protein-Banden, die hauptsächlich im Bereich von etwa 30 kDa liegen. Der Zusatz des Akzeptor-Tripeptids Benzoyl-N-L-T-amid zur *in vitro* Translokation führt dazu, daß die Menge dieser Proteine mit Molekulargewichten um etwa 30 kDa abnimmt (Spur 3).

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß die höher-molekularen Proteine mit Molekulargewichten um etwa 30 kDa in der Anwesenheit von RM N-glykosyliert werden und dem g-GP-C<sub>142</sub>-HA entsprechen. Die Heterogenität der Banden läßt vermuten, daß nicht alle möglichen N-Glykosylierungsstellen in allen GP-C<sub>142</sub>-HA-Molekülen genutzt werden.

Unter Verwendung der anti-HA- und anti-SS<sub>7</sub>-Ak wurde anschließend untersucht, ob die SS vom g-GP-C<sub>142</sub>-HA abgespaltet wird.

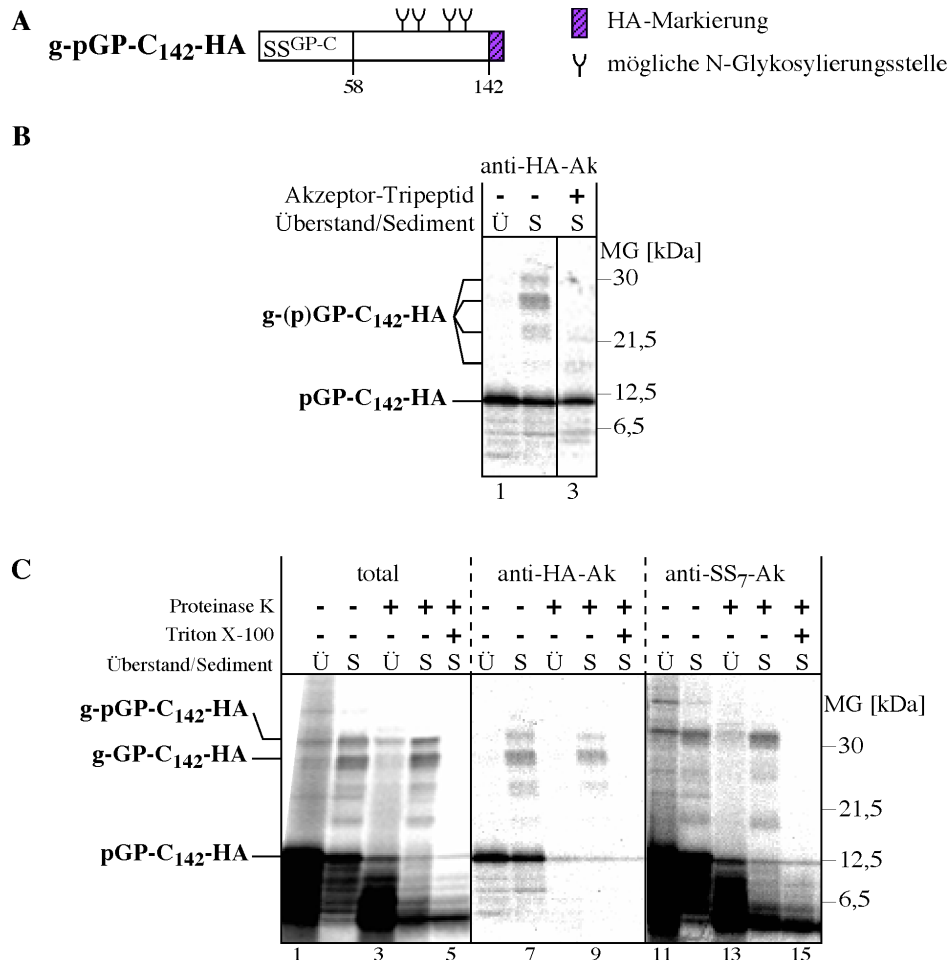
Bei der *in vitro* Translation in Anwesenheit von RM befinden sich die g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine mit Molekulargewichten von überwiegend etwa 30 kDa ausschließlich im Sediment (Abb. 11 C: Spuren 1 und 2). Durch die Behandlung der Sedimente mit Proteinase K werden die g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine in Abwesenheit von Triton X-100 nicht abgebaut (Spur 4), während sie in Anwesenheit von Triton X-100 vollständig verdaut werden (Spur 5).

Bei der Immunpräzipitation mit dem anti-HA-Ak werden sowohl im unbehandelten Sediment als auch nach Proteinase K-Behandlung des Sedimentes die vier N-glykosylierten Formen der g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine präzipitiert (Spuren 7 und 8). Unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak wird im Sediment sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Proteinase K



## Ergebnisse

bevorzugt dasjenige g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Protein mit dem höchsten Molekulargewicht präzipitiert (Spuren 12 und 14). Das zweitgrößte g-GP-C<sub>142</sub>-HA wird überhaupt nicht und die beiden kleinsten g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine in geringeren Mengen präzipitiert. Die SS wird also bei einem Anteil des translozierten und N-glykosylierten g-GP-C<sub>142</sub>-HA abgespaltet.



**Abb. 11 Charakterisierung der Translokation des pGP-C<sub>142</sub>-HA**

A.) Schematische Darstellung des pGP-C<sub>142</sub>-HA mit den möglichen N-Glykosylierungsstellen

B.) N-Glykosylierung des (p)GP-C<sub>142</sub>-HA

Eine mRNS, die für pGP-C<sub>142</sub>-HA kodiert, wurde *in vitro* in Anwesenheit von RM translatiert. Eine Reaktion wurde in Anwesenheit des Akzeptor-Tripeptids Benzoyl-NLT-amid durchgeführt. Nach der Reaktion wurde Puromycin zugegeben und die Sedimente (S) von den Überständen (Ü) durch Ultrazentrifugation getrennt. Unter Verwendung des anti-HA-Ak wurde eine IP unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer SDS-PAGE nach Lämmli.

(p): Bei diesen Proteinen handelt es sich entweder um das Pre-Protein oder das reife Protein.

C.) Immunopräzipitation des (p)GP-C<sub>142</sub>-HA mit dem anti-HA- bzw. anti-SS<sub>7</sub>-Ak

Nach der Translations-/Translokationsreaktion in Anwesenheit von RM wurde der Überstand (Ü) vom Sediment (S) getrennt und einige Proben mit Proteinase K bzw. Proteinase K/Triton X-100 behandelt. Die Proteine der Proben wurden entweder direkt (total) oder nach Immunopräzipitation mit dem anti-HA- bzw. anti-SS<sub>7</sub>-Ak in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

Die synthetisierten und translozierten Mengen von pGP-C<sub>142</sub>-HA und der vier g-GP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine im Sediment nach Proteinase K-Verdau wurden quantifiziert (Spur 4). Aus dem

## Ergebnisse

Verhältnis dieser Mengen kann berechnet werden, daß etwa 90% des translozierten pGP-C<sub>142</sub>-HA zu g-GP-C<sub>142</sub>-HA N-glykosyliert werden.

Zusätzlich wurden die Mengen des g-GP-C<sub>142</sub>-HA und der drei Formen der g-pGP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine zueinander in Bezug gesetzt. Daraus ergibt sich, daß von 40% des N-glykosylierten GP-C<sub>142</sub>-HA die SS abgespaltet werden (g-GP-C<sub>142</sub>-HA).

### 3.2 Intrazellulärer Transport und proteolytische Prozessierung des Glykoproteins

Das Glykoprotein des LCMV wird nach einer akuten Infektion von Zellen entlang des Sekretorischen Weges zur PM transportiert. Hierbei wird es N-glykosyliert und innerhalb 75 bis 90 Minuten durch eine zelluläre Protease in g-GP-1 und g-GP-2 gespaltet. Die N-Glykosylierung des pGP-C ist für den Transport und die spätere Spaltung notwendig. Da beim g-GP-1 die ersten 58 Aminosäuren des pGP-C nicht mehr vorhanden sind, wurde postuliert, daß diese Sequenz eine SS darstellt, die im ER abgespaltet wird.

Die meisten bisher untersuchten SS werden wahrscheinlich gleich nach ihrer Abspaltung vom Pre-Protein abgebaut. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente (mit pGP-C<sub>142</sub>, pGP-C<sub>142</sub>-HA und \*SS<sup>GP-C</sup>-PL) deuten jedoch darauf hin, daß die Signalsequenz des pGP-C nicht effizient prozessiert wird. Dies könnte eine spezifische Eigenschaft dieser SS sein. Daher sollte untersucht werden, ob die SS-Abspaltung vom pGP-C auch in Zellen ungewöhnlich ist. Der intrazelluläre Transport des Glykoproteins, die Abspaltung der N-terminalen 58 Aminosäuren und die Spaltung in g-GP-1 und g-GP-2 sollten daher nach transienter Transfektion bzw. Infektion von kultivierten HeLa- bzw. MC57-Zellen *in vivo* verfolgt werden. Dazu wurde die Methode der sogenannten radioaktiven metabolischen Markierung verwendet, bei der in die neu synthetisierten Proteine radioaktive Aminosäuren eingebaut werden. Anschließend werden die Zellen über unterschiedliche Zeiträume in nicht-radioaktivem Nährmedium weiter inkubiert. In Kombination mit einer Immunopräzipitation unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (anti-SS<sub>7</sub>-Ak und anti-HA-Ak) können so die Prozessierungen des radioaktiv markierten Glykoproteins während des intrazellulären Transportes verfolgt werden.

#### 3.2.1 Überblick über die *in vivo* verwendeten Konstrukte

Da bekannt ist, daß die Expression von pGP-C in Zellen meist nur sehr ineffizient ist, wurden verschiedene Konstrukte des Glykoproteins in HeLa-Zellen transfiziert. Eine C-terminale HA-Markierung sollte dabei der Identifizierung der exprimierten Glykoproteine dienen.

Neben der cDNS des authentischen pGP-C und des pGP-C mit HA-Markierung (pGP-C-HA) wurden auch die cDNS von verkürzten pGP-C-Formen (pGP-C<sub>362</sub>-HA, pGP-C<sub>219</sub>-HA, pGP-1-HA und pGP-C<sub>142</sub>-HA) in den pSV511-Expressionsvektor inseriert. Zusätzlich wurde die cDNS eines Fusionsproteins, das aus der SS<sup>GP-C</sup> und Prolaktin (PL) mit einer C-terminalen HA-Markierung besteht (SS<sup>GP-C</sup>-PL-HA), hergestellt und in den pSV511-Expressionsvektor

## Ergebnisse

---

insetiert. Als Kontrollen wurden zwei pSV511-Expressionsvektoren verwendet, die entweder die cDNS der Invarianten Kette (Iip33) oder keine insetierte cDNS (Vektor) enthält.

### 3.2.2 Expression verschiedener Konstrukte des pGP-C

HeLa-Zellen wurden transient mit dem Vektor oder einem der Expressionsvektoren transfiziert, radioaktiv markiert und analysiert. Nach einer IP mit dem anti-HA-Ak unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proben mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt. Dies führt zur der vollständigen Abspaltung aller Oligosaccharid-Ketten N-glykosylierter Proteine. Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

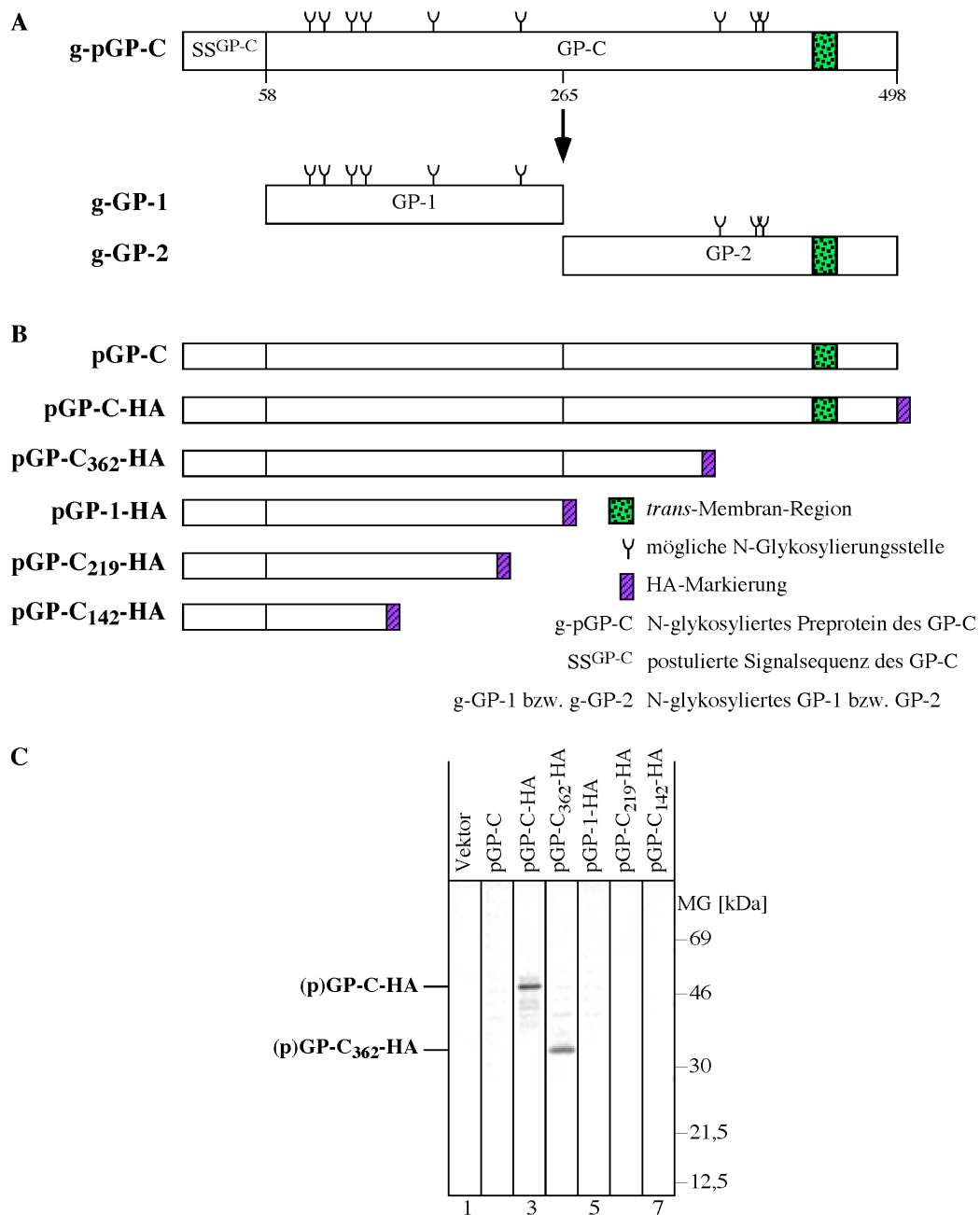
Wenn die Zellen mit dem Expressionsvektor für pGP-C-HA transfiziert werden, präzipitiert der anti-HA-Ak ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa (Abb. 12 C: Spur 3). Im Gegensatz dazu erkennt dieser Antikörper kein Protein, wenn die Zellen mit dem Vektor oder dem pGP-C-Konstrukt transfiziert werden (Spuren 1 und 2). Wenn für die Transfektion das pGP-C<sub>362</sub>-HA-Konstrukt verwendet wird, präzipitiert der anti-HA-Ak ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa (Spur 4). Die errechneten Molekulargewichte für pGP-C-HA bzw. pGP-C<sub>362</sub>-HA betragen 56 bzw. 40 kDa. Die vom anti-HA-Ak präzipitierten Proteine entsprechen wahrscheinlich den Proteinen g-(p)GP-C-HA und g-(p)GP-C<sub>362</sub>-HA, die durch PNGase F-Behandlung zu (p)GP-C-HA und (p)GP-C<sub>362</sub>-HA de-glykosyliert werden.

Bei der Prozessierung des pGP-C-HA bzw. pGP-C<sub>362</sub>-HA könnten die Proteine pGP-2-HA bzw. pGP-2<sub>97</sub>-HA mit errechneten Molekulargewichten von 27 bzw. 11 kDa entstehen. Diese proteolytischen Prozessierungsprodukte sind nicht zu erkennen.

Wenn die Zellen mit dem Expressionvektor für pGP-1-HA, pGP-C<sub>219</sub>-HA oder pGP-C<sub>142</sub>-HA transfiziert werden, präzipitiert der anti-HA-Ak keine Proteine. Diese Proteine werden entweder nicht synthetisiert oder sofort nach der Synthese abgebaut.

Wenn das SS<sup>GP-C</sup>-PL-HA-Konstrukt transfiziert wird, präzipitiert der anti-HA-Ak eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte handelt (nicht gezeigt). Die Expression dieses Proteins wurde nicht weiter untersucht. Wenn für die Expression der verschiedenen pGP-C-Konstrukte Vero- oder 293T-Zellen verwendet werden, kann lediglich eine sehr geringe Menge des pGP-C-HA bzw. pGP-C<sub>362</sub>-HA präzipitiert werden (nicht gezeigt). Daher wurden alle weiteren Transfektionsexperimente ausschließlich in HeLa-Zellen durchgeführt.

## Ergebnisse



**Abb. 12 Expression verschiedener Konstrukte des pGP-C**

A.) Schematische Darstellung der Prozessierung des pGP-C in GP-1 und GP-2

B.) Schematische Darstellung der verschiedenen Konstrukte für die Expression *in vivo*

C.) Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion für 30 Minuten radioaktiv markiert und eine IP unter denaturierenden Bedingungen mit dem anti-HA-Ak durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit PNGase F behandelt und die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

(p): Bei diesen Proteinen handelt es sich entweder um das Pre-Protein oder das reife Protein.

### 3.2.3 Stabilität und N-Glykosylierung des pGP-C-HA

Nach der radioaktiven metabolischen Markierung der transfizierten HeLa-Zellen kann das Prozessierungsprodukt g-GP-2-HA des g-GP-C-HA nicht nachgewiesen werden.

Die N-Glykosylierung des pGP-C (g-pGP-C) ist für die spätere Prozessierung in infizierten Zellen notwendig. Daher sollte untersucht werden, ob das pGP-C-HA in transfizierten HeLa-Zellen N-glykosyliert wird. Da das pGP-C in infizierten Zellen nicht gleichmäßig N-glykosyliert wird und folglich nicht quantitativ erfaßt werden kann, sollten bei einem Teil der Proben durch eine PNGase F-Behandlung die Oligosaccharid-Ketten abgespalten und somit ein vollständig de-glykosyliertes (p)GP-C-HA erhalten werden.

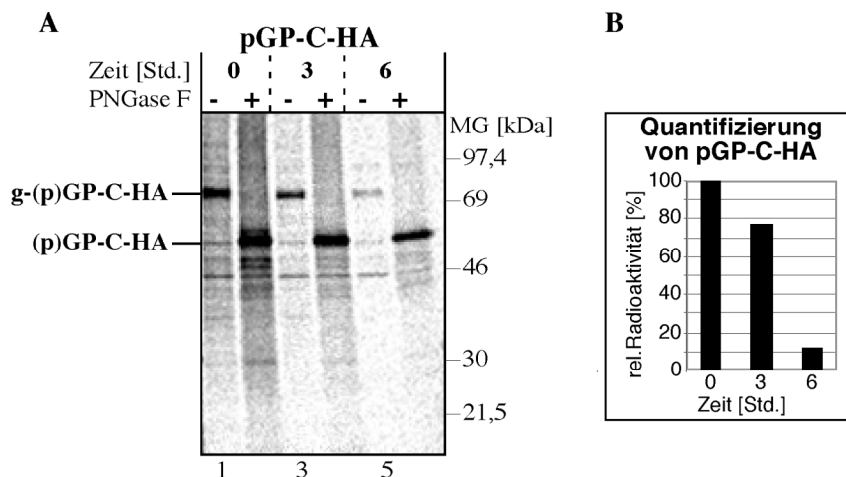
Das LCMV-Glykoprotein wird während des intrazellulären Transportes in infizierten Zellen erst nach 75 bis 90 Minuten proteolytisch in g-GP-1 und g-GP-2 prozessiert. Daher wurde untersucht, ob innerhalb eines längeren Zeitraumes von sechs Stunden eine Prozessierung des (p)GP-C-HA in transfizierten HeLa-Zellen erfolgt.

HeLa-Zellen wurden nach Transfektion radioaktiv markiert und entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder weitere drei (Zeit 3) bzw. sechs Stunden (Zeit 6) in nicht-radioaktivem Nährmedium kultiviert und erst anschließend analysiert. Nach der IP mit dem anti-HA-Ak unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Teil der Proben mit PNGase F behandelt.

Der anti-HA-Ak präzipitiert kein Protein, wenn ein Zell-Lysat von Vektor-transfizierten Zellen für die IP verwendet wird (Abb. 13 A: Spuren 1 und 2). Wenn die mit dem pGP-C-HA-Konstrukt transfizierten Zellen direkt nach der radioaktiven Markierung aufgeschlossen werden, präzipitiert der anti-HA-Ak hauptsächlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa (Spur 3). Hierbei könnte es sich um ein N-glykosyliertes pGP-C-HA-Protein handeln, das abhängig von der Anzahl der gebundenen Oligosaccharid-Ketten ein errechnetes Molekulargewicht zwischen 59 und 83 kDa besitzt. Wenn die Proteine nach der IP mit PNGase F behandelt werden, ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa vorhanden (Spur 4). Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht des unglykosylierten pGP-C-HA-Proteins von 56 kDa. Wenn die Zellen für weitere drei bzw. sechs Stunden in nicht-radioaktivem Nährmedium kultiviert werden, nimmt die Menge an präzipitiertem g-(p)GP-C-HA bzw. (p)GP-C-HA ab (Spuren 5 und 6 bzw. 7 und 8). Innerhalb des untersuchten Zeitraumes kann kein Protein beobachtet werden, dessen Menge zunimmt und daher das Prozessierungsprodukt g-GP-2-HA bzw. GP-2-HA mit errechneten Molekulargewichten von 35,6 bzw. 26,6 kDa darstellen könnte.

Die präzipitierten Protein-Mengen des de-glykosylierten (p)GP-C-HA zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden quantifiziert und daraus eine Halbwertszeit von etwa 3,5 Stunden berechnet (Abb. 13 B).

## Ergebnisse



**Abb. 13 Stabilität und N-Glykosylierung des pGP-C-HA**

A.) HeLa-Zellen wurden transient mit dem pGP-C-HA-Expressionsvektor transfiziert und radioaktiv markiert. Die Zellen wurden entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder zunächst für weitere 3 bzw. 6 Stunden bei 37°C in nicht-radioaktivem Medium inkubiert und anschließend analysiert (Zeit 3 bzw. 6). Die Durchführung der Immunpräzipitationen erfolgte unter Verwendung des anti-HA-Ak bei denaturierenden Bedingungen. Die Proteine wurden entweder mit Wasser oder mit PNGase F behandelt und anschließend in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

B.) Quantifizierung der immunpräzipitierten Mengen an pGP-C-HA

Die Menge des immunpräzipitierten pGP-C-HA zur Zeit 0 wurde gleich 100% gesetzt. Die zu den Zeitpunkten 3 und 6 präzipitierten Mengen an pGP-C-HA wurden auf diesen Wert bezogen.

(p): Bei diesen Proteinen handelt es sich entweder um das Pre-Protein oder das reife Protein.

### 3.2.4 Sensitivität des g-pGP-C-HA gegenüber Endo H und PNGase F

N-glykosylierte Proteine zeichnen sich durch Oligosaccharid-Ketten aus, die im ER an bestimmte Asparagin-Seitenketten der Polypeptidkette gebunden werden. Asparagin-gekoppelte Oligosaccharid-Ketten von Glykoproteinen, die entlang des Sekretorischen Weges transportiert werden, können modifiziert werden. Hat das Glykoprotein das ER noch nicht verlassen, besitzen diese Oligosaccharid-Ketten viele Mannose-Reste und können durch Behandlung mit Endoglykosidase H (Endo H) abgespaltet werden. Am Protein bleibt nach dieser Behandlung lediglich jeweils ein Zuckerrest zurück. Werden diese Mannose-reichen Oligosaccharid-Ketten aber im Golgi-Apparat zu komplexen Oligosaccharid-Ketten modifiziert, können sie durch Endo H nicht mehr abgespaltet werden. Im Gegensatz zu Endo H spaltet PNGase F unabhängig von im Golgi-Apparat erfolgten Modifikationen die Oligosaccharid-Kette ab. Dabei bleibt kein Zuckerrest am Protein zurück. Durch Behandlung mit Endo H kann also unterschieden werden, ob das Glykoprotein den Golgi-Apparat erreicht hat. Viele Proteine, die über den Sekretorischen Weg transportiert werden, benötigen für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat 10 bis 30 Minuten.

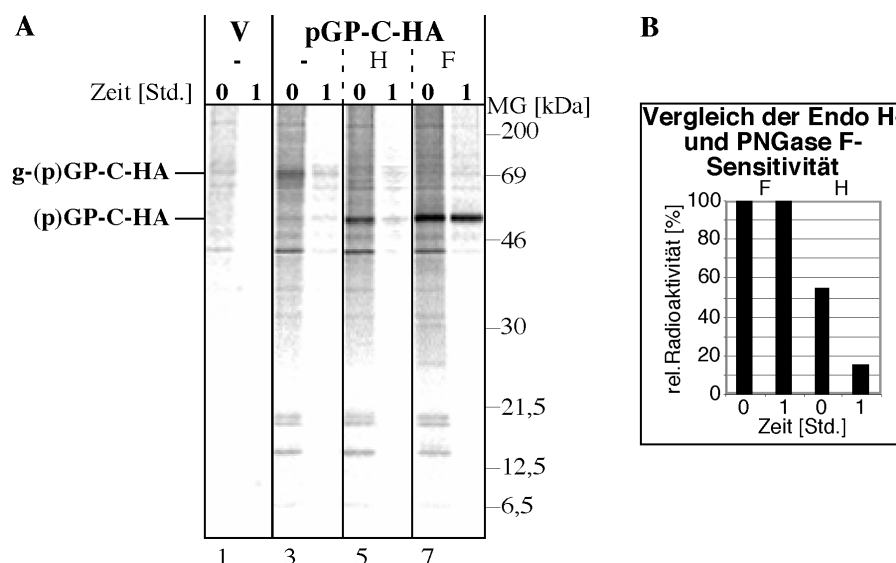
Es sollte untersucht werden, ob das (p)GP-C-HA innerhalb einer Stunde aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert wird. Als Kontrolle wurde die Invariante Kette verwendet, die in

## Ergebnisse

HeLa-Zellen in sehr geringen Mengen aus dem ER transportiert wird, wenn keine MHC I-Moleküle exprimiert werden (Lotteau *et al.*, 1990).

HeLa-Zellen wurden nach Transfektion für einen Zeitraum von 30 Minuten radioaktiv markiert und entweder sofort (Zeit 0) oder nach einstündiger Inkubation in nicht-radioaktivem Nährmedium analysiert (Zeit 1). Eine IP unter nativen Bedingungen wurde mit dem anti-HA-Ak bzw. anti-Ii-Ak durchgeführt und ein Teil der Proben mit Endo H (H) oder PNGase F (F) behandelt.

Wenn die Zellen mit dem pGP-C-HA-Konstrukt transfiziert werden, kann unter Verwendung des anti-HA-Ak ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa präzipitiert werden, das einem N-glykosylierten (p)GP-C-HA (g-(p)GP-C-HA) entsprechen könnte (Abb. 14 A: Spuren 3 und 4). Dieses Protein ist nicht vorhanden, wenn die Zellen mit dem Vektor transfiziert werden (Spuren 1 und 2). Wenn die Proben nach der IP mit Endo H (H) oder PNGase F (F) behandelt werden, kann bei beiden untersuchten Zeitpunkten hauptsächlich eine Protein-Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa erkannt werden (Spuren 5 bis 8). Das Molekulargewicht dieses Proteins stimmt ungefähr mit dem errechneten Molekulargewicht von 56 kDa für das nicht-glykosylierte pGP-C-HA überein.



**Abb. 14 Sensitivität des g-pGP-C-HA gegenüber Endo H und PNGase F**

A.) HeLa-Zellen wurden transient mit einem Vektor (V) oder dem pGP-C-HA-Expressionsvektor transfiziert und radioaktiv markiert. Die Zellen wurden entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder zunächst für eine weitere Stunde bei 37°C in nicht-radioaktivem Medium inkubiert und anschließend analysiert (Zeit 1). Mit dem anti-HA-Ak (pGP-C-HA) wurden Immunopräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden entweder mit Wasser (-), Endo H (H) oder PNGase F (F) behandelt und anschließend die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

B.) Quantifizierung der immunopräzipitierten Mengen an (p)GP-C-HA

Die Mengen des immunopräzipitierten (p)GP-C-HA nach PNGase F-Behandlung zu den Zeiten 0 und 1 wurden gleich 100% gesetzt (F) und die präzipitierten Mengen an (p)GP-C-HA nach Endo H-Behandlung zu den Zeiten 0 und 1 jeweils auf diese Werte bezogen (H).

(p): Bei diesen Proteinen handelt es sich entweder um das Pre-Protein oder das reife Protein.

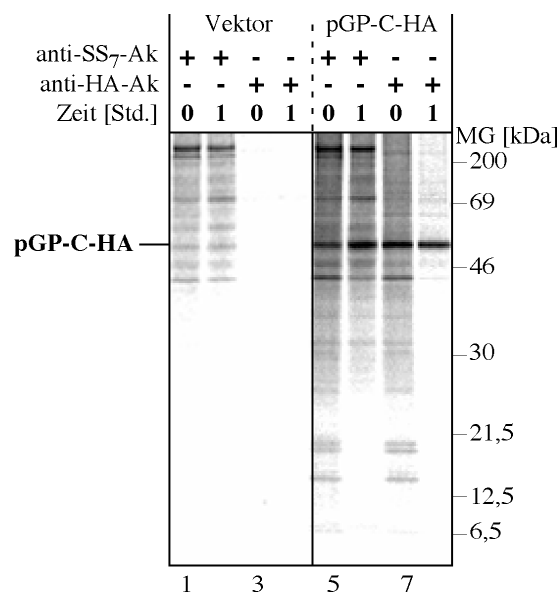
## Ergebnisse

Die Oligosaccharide der nach Transfektion von Zellen exprimierten Invarianten Kette sind zu beiden untersuchten Zeiten fast vollständig sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Endo H (nicht gezeigt). Daher führt eine Endo H-Behandlung von N-glykosylierten Proteinen unter den gewählten Bedingungen wahrscheinlich zur Abspaltung aller Endo H-sensitiven Oligosaccharide.

Die präzipitierten Mengen des 55 kDa-Proteins nach Endo H- und PNGase F-Behandlung zu den Zeiten 0 und 1 wurden quantifiziert (Abb. 14 B). Aus dem Vergleich dieser Protein-Mengen folgt, daß nur 40% der mit dem anti-HA-Ak präzipitierten Protein-Menge innerhalb einer Stunde resistent gegenüber Endo H-Verdau werden und damit die entsprechenden Oligosaccharid-Ketten im Golgi-Apparat modifiziert sind.

### 3.2.5 Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C-HA

Es sollte untersucht werden, ob die SS des pGP-C-HA abgespaltet wird. Nach Transfektion und radioaktiver Markierung von HeLa-Zellen wurde daher eine IP unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>- und anti-HA-Ak unter nativen Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließend eine PNGase F-Behandlung durchgeführt.



**Abb. 15 Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C-HA**

HeLa-Zellen wurden transient mit einem Vektor oder dem pGP-C-HA-Expressionsvektor transfiziert und radioaktiv markiert. Die Zellen wurden entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder mit nicht-radioaktivem Medium eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend untersucht (Zeit 1). Mit den anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-HA-Ak wurden Immunopräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt und die Proben mit PNGase F behandelt. Die anschließende Proteinauftrennung erfolgte in einer SDS-PAGE nach Lämmli.



## Ergebnisse

---

Ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa wird sowohl vom anti-SS<sub>7</sub>- als auch vom anti-HA-Ak zu den Zeitpunkten 0 und 1 präzipitiert, wenn die Zellen mit dem pGP-C-HA-Konstrukt transfiziert werden, aber nicht nach Transfektion mit dem Vektor (Abb. 15: Spuren 5 bis 8 und 1 bis 4).

Die vom anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-HA-Ak präzipitierte Protein-Menge nimmt innerhalb einer Stunde etwas ab (Spuren 5 und 6 bzw. 7 und 8). Im Vergleich zum anti-HA-Ak kann der anti-SS<sub>7</sub>-Ak eine geringere Menge präzipitieren.

Interessant ist, daß sowohl mit dem anti-SS<sub>7</sub>- als auch mit dem anti-HA-Ak zusätzlich drei Proteine mit Molekulargewichten zwischen 12,5 und 21,5 kDa zum Zeitpunkt 0 aber nicht zum Zeitpunkt 1 präzipitiert werden (Spuren 5 bis 8). Diese Protein-Banden sind nicht vorhanden, wenn die Zellen mit dem Vektor transfiziert werden (vgl. Abb. 14 A). Außerdem treten sie nach IP mit dem anti-HA-Ak unabhängig von nachfolgenden Behandlungen auf (vgl. Abb. 14 A). Diese Proteine wurden nicht weiter charakterisiert.

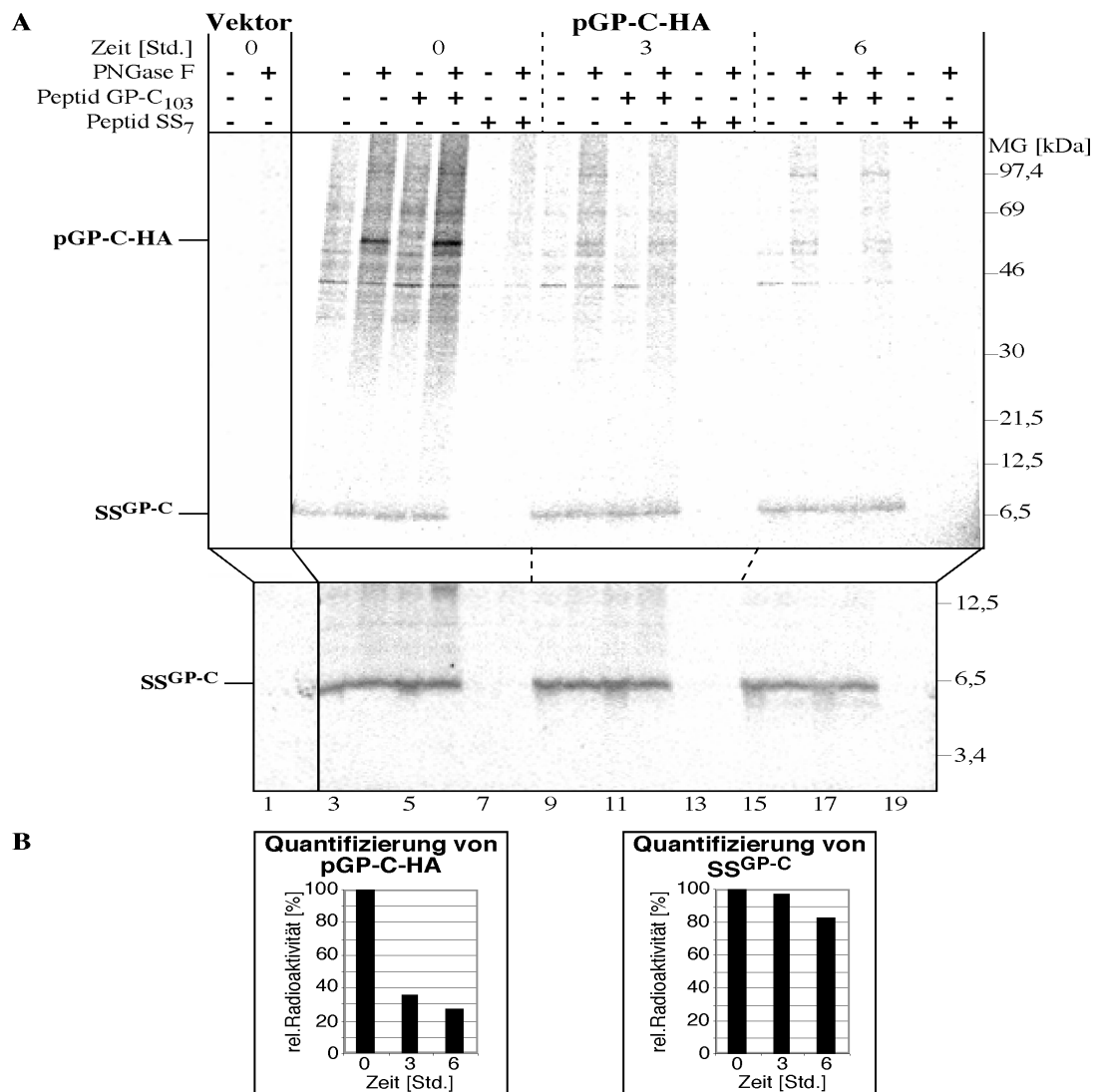
Dieses Experiment zeigt, daß zumindest von einem Anteil der pGP-C-HA-Proteine die SS nicht kotranslational und auch nach einer Stunde noch nicht vollständig abgespaltet wird.

### 3.2.6 Identifizierung der abgespalteten Signalsequenz des pGP-C-HA

Da abgespaltete SS meist nicht in Zellen nachgewiesen werden konnten, wird angenommen, daß sie häufig relativ schnell weiter proteolytisch prozessiert und abgebaut werden. Die *in vitro* Experimente deuten darauf hin, daß die abgespaltete SS nicht prozessiert wird. Daher sollte unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak untersucht werden, ob in transfizierten HeLa-Zellen die SS vom pGP-C-HA abgespaltet wird und nachgewiesen werden kann. Radioaktiv markierte Zell-Lysate wurden hergestellt, eine IP unter denaturierenden Bedingungen und anschließende Behandlungen durchgeführt, wie sie in Abb. 13 beschrieben sind.

Die abgespaltete SS des pGP-C-HA ist mit einem errechneten Molekulargewicht von 6,4 kDa sehr schwer in einer SDS-PAGE nach Lämmli zu identifizieren. Die präzipitierten Proteine wurden daher zusätzlich in einer SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow aufgetrennt, welches die Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 3 und 20 kDa erlaubt.

## Ergebnisse



**Abb. 16 Identifizierung der abgespalteten Signalsequenz des pGP-C-HA**

A.) HeLa-Zellen wurden transient transfiziert, radioaktiv markiert und entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder mit nicht-radioaktivem Medium weitere 3 bzw. 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend untersucht (Zeiten 3 bzw. 6). Mit dem anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-HA-Ak wurden Immunopräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde entweder kein Peptid, das Kontroll-Peptid GP-C<sub>103</sub> oder das spezifische Peptid SS<sub>7</sub> zugegeben. Die Proben wurden entweder mit Wasser oder PNGase F behandelt. Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli und nach Schägger/von Jagow aufgetrennt.

B.) Quantifizierung der immunopräzipitierten Mengen an pGP-C-HA und der abgespalteten Signalsequenz  
Die Mengen des immunopräzipitierten pGP-C-HA nach der Auftrennung in der SDS-PAGE nach Lämmli und der abgespalteten Signalsequenz nach der Auftrennung in der SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow wurden quantifiziert. Die präzipitierten Mengen des pGP-C-HA bzw. der SS<sup>GP-C</sup> zur Zeit 0 wurden gleich 100% gesetzt und die jeweiligen Mengen zu den Zeiten 3 und 6 auf diese Werte bezogen.

Nach der Transfektion der Zellen mit dem Vektor kann der anti-SS<sub>7</sub>-Ak auch unter denaturierenden Bedingungen kein Protein präzipitieren (Abb. 16 A, SDS-PAGE nach Lämmli und nach Schägger/von Jagow: Spuren 1 und 2). Wenn die Zellen mit dem

## Ergebnisse

pGP-C-HA-Konstrukt transfiziert und die immunpräzipitierten Proteine mit PNGase F behandelt werden, kann das pGP-C-HA zum Zeitpunkt 0 erkannt werden (Abb. 16 A, SDS-PAGE nach Lämmli: Spur 4). Ohne eine anschließende Behandlung mit PNGase F ist kein entsprechendes g-pGP-C-HA sichtbar (Spur 3). Wird zur IP zusätzlich das Peptid GP-C<sub>103</sub> hinzu gegeben, kann das pGP-C-HA ebenfalls präzipitiert werden (Spuren 5 und 6). Im Gegensatz dazu verhindert die Zugabe des spezifischen Peptids SS<sub>7</sub> die Immunpräzipitation des pGP-C-HA vollständig (Spuren 7 und 8). Nach drei und sechs Stunden ist nur eine sehr geringe Menge an pGP-C-HA sichtbar (Spuren 10 und 16).

Unabhängig von der PNGase F-Behandlung wird ein 6 kDa-Protein spezifisch vom anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert (Abb. 16 A, SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow: Spuren 3 bis 8). Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich um die abgespaltete SS mit einem errechneten Molekulargewicht von 6,4 kDa. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieses 6 kDa-Protein deshalb als abgespaltete SS (SS<sup>GP-C</sup>) bezeichnet.

Die Mengen des präzipitierten pGP-C-HA und der SS<sup>GP-C</sup> zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden quantifiziert (Abb. 16 B). Daraus ergibt sich für das pGP-C-HA, das die SS noch besitzt, eine Halbwertszeit von etwa vier Stunden. Es kann nicht unterschieden werden, ob das reife GP-C-HA abgebaut wird oder eine posttranslationale SS-Abspaltung erfolgt. Aus den Mengen der präzipitierten SS<sup>GP-C</sup> kann im Vergleich dazu eine sehr viel höhere Halbwertszeit von etwa 24 Stunden berechnet werden.

Die präzipitierten Protein-Mengen des pGP-C-HA in der SDS-PAGE nach Lämmli und der abgespalteten SS in der SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow wurden miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung der Anzahl aller in den jeweiligen Proteinen vorhandenen radioaktiv markierten Aminosäuren wurde das molare Verhältnis dieser beiden Proteine zueinander berechnet. Danach liegt die abgespaltete SS zum Zeitpunkt 0 in einem dreifachen molaren Überschuß im Verhältnis zum Pre-Protein pGP-C-HA vor.

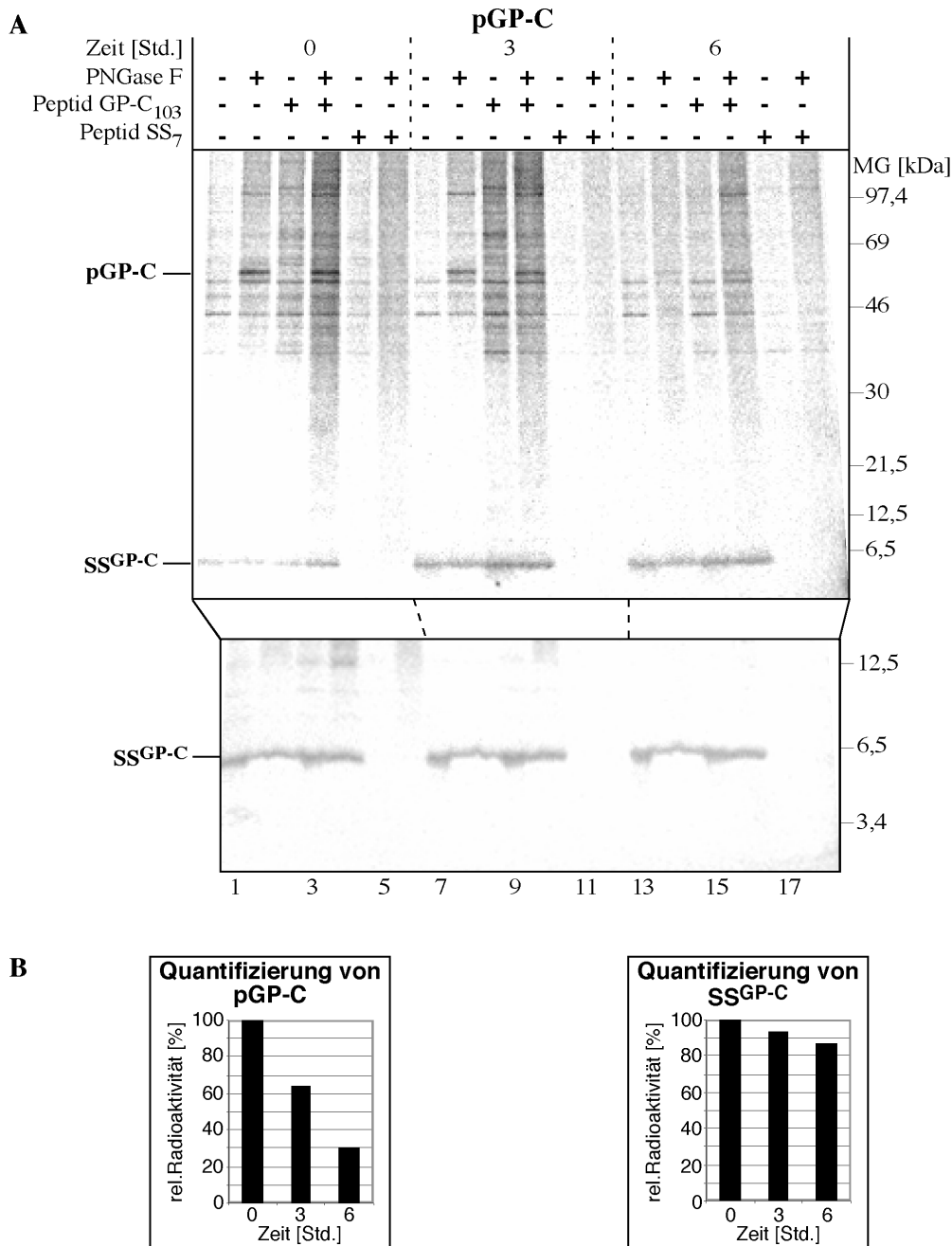
Da sowohl das Pre-Protein pGP-C-HA als auch die abgespaltete SS mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert werden, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, daß die SS<sup>GP-C</sup> nur von einem Anteil des pGP-C-HA kurz nach dessen Synthese abgespaltet wird.

### 3.2.7 Die Abspaltung der Signalsequenz vom pGP-C

Die HA-Markierung des pGP-C-HA könnte einen Einfluß auf die SS-Abspaltung und die Stabilität des pGP-C sowie der abgespalteten SS besitzen. Um dies zu untersuchen, sollte das authentische pGP-C in HeLa-Zellen exprimiert und charakterisiert werden.

Nach radioaktiver Markierung der transfizierten Zellen kann sowohl das pGP-C als auch die abgespaltete SS nach PNGase F-Behandlung zu den Zeiten 0, 3 und 6 durch den anti-SS<sub>7</sub>-Ak spezifisch präzipitiert werden (Abb. 17 A: Spuren 1 bis 18).

## Ergebnisse



**Abb. 17 Die Abspaltung der Signalsequenz vom pGP-C**

A.) Das vorherige Experiment (Abb. 16) wurde wiederholt unter Verwendung des pGP-C. Die Proteinauftrennung erfolgte in einer SDS-PAGE nach Lämmli.

B.) Quantifizierung der immunpräzipitierten Mengen an pGP-C und SS<sup>GP-C</sup>

Die Menge des immunpräzipitierten pGP-C bzw. SS<sup>GP-C</sup> nach PNGase F-Behandlung zur Zeit 0 wurde gleich 100% gesetzt (Spur 2) und die präzipitierten Mengen an pGP-C bzw. SS<sup>GP-C</sup> zu den Zeiten 3 und 6 auf diese Werte bezogen.

Die Mengen der präzipitierten Proteine pGP-C in der SDS-PAGE nach Lämmli und SS<sup>GP-C</sup> in der SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow zu den einzelnen Zeiten wurden quantifiziert (Abb. 17 B). Die errechnete Halbwertszeit des mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitierten pGP-C beträgt

## Ergebnisse

fünf Stunden. Dies entspricht etwa dem für pGP-C-HA erhaltenen Wert von vier Stunden, der ebenfalls für den anti-SS<sub>7</sub>-Ak berechnet wurde (vgl. Abb. 16 A). Damit hat die C-terminale HA-Markierung keinen Einfluß auf die Stabilität des pGP-C, das die SS<sup>GP-C</sup> noch besitzt.

Für die abgespaltete SS des pGP-C wurde eine Halbwertszeit von etwa 24 Stunden berechnet. Zusätzlich konnte ein dreifacher molarer Überschuß an SS<sup>GP-C</sup> im Vergleich zu pGP-C zum Zeitpunkt 0 festgestellt werden. Sowohl die Halbwertszeit der abgespalteten SS als auch der molare Überschuß der SS<sup>GP-C</sup> im Vergleich zu pGP-C zum Zeitpunkt 0 entsprechen den für pGP-C-HA erhaltenen Werten. Damit hat die HA-Markierung auch auf diese Werte keinen Einfluß.

### 3.2.8 Membran-Assoziation der abgespalteten Signalsequenz

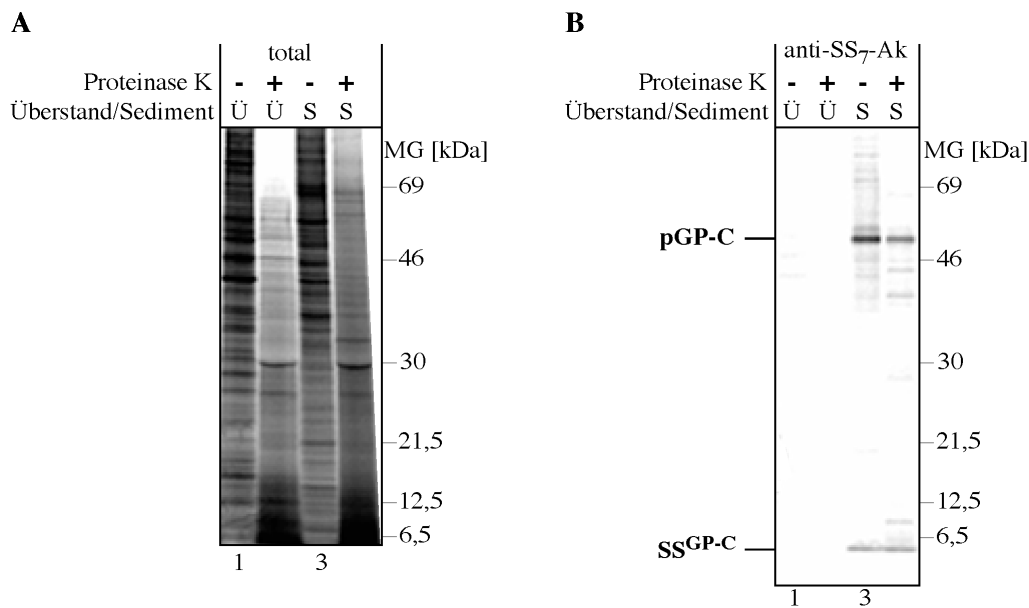
Die Biosynthese des LCMV-Glykoproteins erfolgt als Typ I *trans*-Membran-Protein, wobei die C-terminale hydrophobe Region das Protein in der ER-Membran verankert. Die SS könnte aufgrund der Hydrophobizität ihrer h-Regionen nach der SS-Abspaltung ebenfalls in der ER-Membran verankert bleiben.

Für die Untersuchung, ob die abgespaltete SS mit Membranen assoziiert ist oder ins Zytosol bzw. ins ER-Lumen entlassen wird, wurden unter nativen Bedingungen die Sedimente vom Überstand durch Ultrazentrifugation getrennt. Außerdem sollte durch Behandlung der Sedimente mit Proteinase K analysiert werden, ob ein Segment der abgespalteten SS auf der zytosolischen Seite der Membranen exponiert ist.

HeLa-Zellen wurden transfiziert, radioaktiv markiert und sollten durch einen hypotonischen Schock aufgebrochen werden. Anschließend wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt und der Überstand von den Sedimenten getrennt. Dadurch sollten im Überstand lediglich das Zytosol und in den Sedimenten alle zellulären Membranen vorhanden sein. Die Membran-Assoziation und Protease-Sensitivität der mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitierten Proteine wurden anschließend untersucht.

Nach der Trennung von Sediment und Überstand sind in beiden Fraktionen diskrete Protein-Banden zu erkennen (Abb. 18 A: Spuren 1 und 3). Nach Proteinase K-Verdau werden die meisten Proteine nahezu vollständig zu nieder-molekularen Produkten abgebaut (Spuren 2 und 4). Daraus kann geschlossen werden, daß die Zellen wirklich aufgebrochen sind und die Proteinase K aktiv ist.

In den Sedimenten kann der anti-SS<sub>7</sub>-Ak sowohl das pGP-C als auch die abgespaltete SS präzipitieren (Abb. 18 B: Spur 3). Bei Zusatz von Proteinase K bleibt die präzipitierte Menge der abgespalteten SS unverändert, während sich die Menge an pGP-C ein wenig verringert (Spur 4). Eine Veränderung der Molekulargewichte dieser beiden Proteine ist nach Proteinase K-Behandlung nicht zu erkennen. Daher scheinen keine größeren Anteile dieser Proteine auf der zytoplasmatischen Seite der Membranen exponiert und sensitiv gegenüber Proteinase K zu sein. Im Gegensatz zu den Sedimenten werden in den Überständen unabhängig von einer Proteinase K-Behandlung weder das pGP-C noch die abgespaltete SS präzipitiert (Spuren 1 und 2).



**Abb. 18 Membran-Assoziation der abgespalteten Signalsequenz**

HeLa-Zellen wurden transient mit dem pGP-C-Expressionsvektor transfiziert, radioaktiv markiert und der Überstand vom Sediment nach Ultrazentrifugation getrennt. Anschließend wurde mit einem Teil der Proben ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Die Proteine von 10% des Volumens wurden in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt (A). Mit 90% des Volumens wurden Immunopräzipitationen mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak unter nativen Bedingungen durchgeführt (B). Anschließend wurden die Proben der IP mit PNGase F behandelt und die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

### 3.2.9 Die Abspaltung der Signalsequenz von einer verkürzten Form des pGP-C

Die hydrophoben Regionen der SS könnten mit der C-terminalen hydrophoben Region des pGP-C wechselwirken und dadurch die Abspaltung der SS<sup>GP-C</sup> beeinflussen. Es sollte daher untersucht werden, ob eine C-terminale Deletion des pGP-C, die auch diese hydrophobe Region umfaßt, einen Einfluß auf die Abspaltung der SS vom Pre-Protein ausübt.

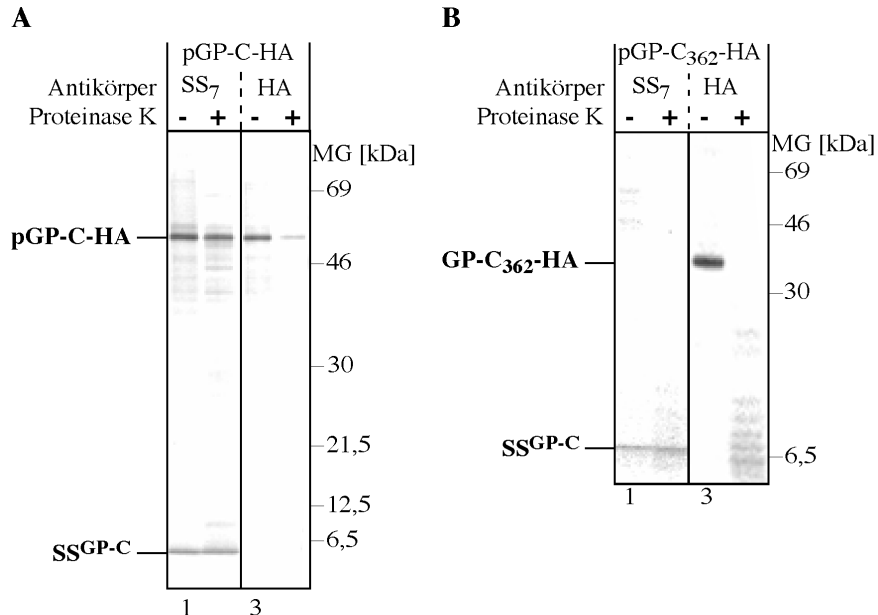
Die Sedimente von transfizierten und radioaktiv markierten Zellen wurden isoliert, resuspendiert und anschließend ein Teil der Proben mit Proteinase K behandelt. Nach einer IP unter denaturierenden Bedingungen wurde eine PNGase F-Behandlung durchgeführt.

Der anti-SS<sub>7</sub>-Ak kann unabhängig von einer Proteinase K-Behandlung in etwa gleichen Mengen sowohl das pGP-C-HA als auch die abgespaltete SS präzipitieren (Abb. 19 A: Spuren 1 und 2). Der anti-HA-Ak erkennt im unbehandelten Sediment das pGP-C-HA (Spur 3). Wenn die Sedimente zuvor mit Proteinase K behandelt werden, präzipitiert der Antikörper das pGP-C-HA in sehr geringen Mengen (Spur 4).

Durch den anti-SS<sub>7</sub>-Ak wird die abgespaltete SS, aber nicht das pGP-C<sub>362</sub>-HA erkannt (Abb. 19 B: Spuren 1 und 2). Das GP-C<sub>362</sub>-HA wird lediglich durch den anti-HA-Ak präzipitiert, wenn keine Proteinase K-Behandlung durchgeführt wird (Spur 3). Durch Proteinase K wird das GP-C<sub>362</sub>-HA hingegen zu nieder-molekularen Fragmenten abgebaut (Spur 4).

## Ergebnisse

Die Deletion der C-terminalen Aminosäuren des pGP-C resultiert wahrscheinlich in einer vollständigen Abspaltung der SS vom pGP-C<sub>362</sub>-HA. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß das pGP-C<sub>362</sub>-HA in den Zellen sehr schnell abgebaut wird, wenn keine SS-Abspaltung erfolgt.



**Abb. 19 Die Abspaltung der Signalsequenz von einer verkürzten Form des pGP-C (GP-C<sub>362</sub>-HA)**

HeLa-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für pGP-C-HA (A) bzw. pGP-C<sub>362</sub>-HA (B) transfiziert, radioaktiv markiert und das Sediment nach Ultrazentrifugation isoliert. Anschließend wurde mit einem Teil der Proben eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt. Mit dem anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-HA-Ak (SS<sub>7</sub> bzw. HA) wurden Immunopräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Alle Proben wurden mit PNGase F behandelt und die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

### 3.2.10 Protease-Sensitivität des pGP-C-HA und der abgespalteten Signalsequenz

Die abgespaltete SS kann durch Proteinase K nicht abgebaut werden. Dies weist auf die Möglichkeit hin, daß die SS<sup>GPC</sup> durch die Membranen vor der Protease geschützt ist. Da auch das Molekulargewicht der abgespalteten SS in Gegenwart von Proteinase K nicht verringert wird, scheint kein Segment der abgespalteten SS auf der zytoplasmatischen Seite der Membranen exponiert zu sein. Durch das Öffnen oder vollständige Auflösen der Membranen vor der Behandlung mit Proteinase K sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen die abgespaltete SS durch diese Protease abgebaut werden kann.

Die Sedimente von transfizierten und radioaktiv markierten Zellen wurden isoliert, resuspendiert, anschließend mit Saponin, Carbonat, Triton X-100 oder SDS und schließlich mit Proteinase K behandelt. Dabei führt die Behandlung der Membranen mit Saponin dazu, daß lösliche Proteine durch die Membran diffundieren können, während durch Carbonat-Behandlung zusätzlich die meisten nicht-kovalenten Protein-Protein-Bindungen unterbrochen werden. Durch Zugabe von Triton X-100 zu den Membranen werden diese vollständig

## Ergebnisse

aufgelöst. Bei der Behandlung der Membranen mit SDS werden zusätzlich Proteine denaturiert.

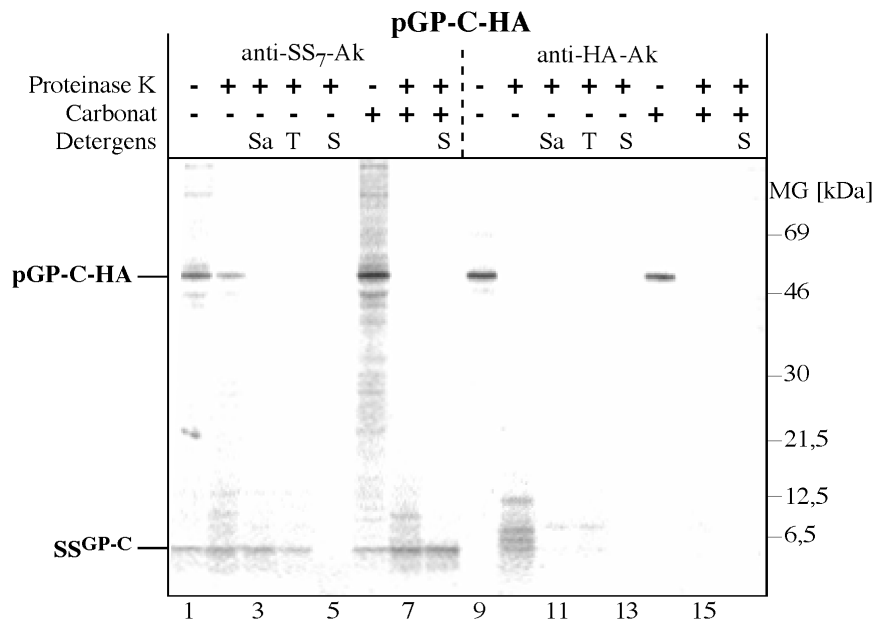
Schließlich wurde nach einer denaturierenden IP eine PNGase F-Behandlung durchgeführt.

Das pGP-C-HA wird mit dem anti-HA-Ak im unbehandelten Sediment präzipitiert (Abb. 20: Spur 9). Durch Behandlung der Sedimente mit Proteinase K wird das pGP-C-HA bis auf C-terminale Fragmente vollständig abgebaut (Spur 10). Wenn die Membranen durch Behandlung mit Saponin (Spur 11), Triton X-100 (Spur 12) oder SDS (Spur 13) durchlässig gemacht bzw. aufgelöst werden, findet ein Abbau des gesamten pGP-C-HA statt.

Nach Behandlung der Sedimente mit Carbonat kann das pGP-C-HA ebenfalls nachgewiesen werden (Spur 14). Das Protein wird jedoch durch Proteinase K in Ab- (Spur 15) oder Anwesenheit (Spur 16) von SDS vollständig abgebaut.

Mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak werden unabhängig von einer Proteinase K-Behandlung sowohl das pGP-C-HA als auch die abgespaltete SS präzipitiert (Spuren 1 und 2). Werden die Membranen durch Behandlung mit Saponin (Spur 3), Triton X-100 (Spur 4) oder SDS (Spur 5) durchlässig gemacht bzw. aufgelöst, findet ein Abbau des pGP-C-HA statt. Die abgespaltete SS wird hingegen nur verdaut, wenn durch SDS die Membranen aufgelöst und Proteine denaturiert werden (Spur 5).

Nach Carbonat-Behandlung können pGP-C-HA und die abgespaltete SS präzipitiert werden (Spur 6). Bei Zusatz von Proteinase K in Ab- (Spur 7) oder Anwesenheit (Spur 8) von SDS wird pGP-C-HA abgebaut, während die abgespaltete SS unverändert bleibt.



**Abb. 20** Protease-Sensitivität des pGP-C-HA und der abgespalteten Signalsequenz

HeLa-Zellen wurden transfiziert, radioaktiv markiert und das Sediment nach Ultrazentrifugation isoliert. Das resuspendierte Sediment wurde mit Carbonat, Saponin (Sa), Triton X-100 (T) bzw. SDS (S) behandelt und eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt. Mit dem anti-SS<sub>7</sub>- bzw. anti-HA-Ak wurden Immunopräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden alle Proben mit PNGase F behandelt und die Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt.

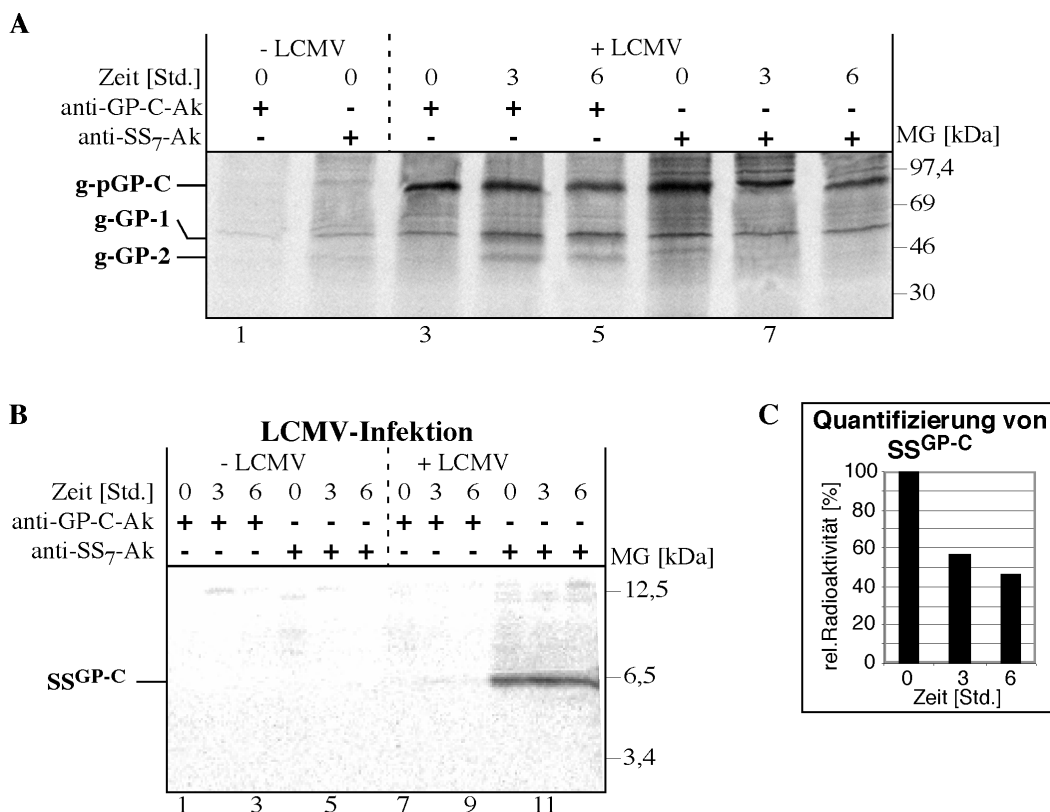


## Ergebnisse

Anhand dieses Experimentes kann geschlossen werden, daß die abgespaltete SS in ihrer gesamten Länge unabhängig von Membranen vor Proteinase K-Verdau geschützt ist. Für diesen Schutz könnten Proteine verantwortlich sein. Der teilweise Schutz des pGP-C-HA gegenüber Proteinase K beruht dagegen ausschließlich auf den intakten Membranen.

### 3.2.11 Stabilität der abgespalteten Signalsequenz nach Infektion mit LCMV

Nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit einem bestimmten pGP-C-Konstrukt wird zusätzlich zu den zellulären Proteinen nur das entsprechende LCMV-Glykoprotein, aber es werden keine weiteren Proteine des Virus exprimiert. Daher sollte der Einfluß von viralen Proteinen nach Infektion von Zellen mit LCMV auf die SS-Abspaltung des pGP-C und die Stabilität der abgespalteten SS untersucht werden.



**Abb. 21 Die abgespaltete Signalsequenz des pGP-C und das pGP-C nach LCMV-Infektion**

MC57-Maus-Fibroblasten wurden mit dem LCM-Virus infiziert oder unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden eine Stunde radioaktiv markiert und entweder sofort analysiert (Zeit 0) oder mit nicht-radioaktivem Medium weitere 3 bzw. 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend untersucht (Zeit 3 bzw. 6). Mit dem anti-GP-C- bzw. anti-SS<sub>7</sub>-Ak wurden Immunopräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt.

A.) Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE nach Lämmli

B.) Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE nach Schägger/von Jagow

C.) Quantifizierung der immunopräzipitierten Mengen der abgespalteten Signalsequenz

Die Mengen der mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak immunopräzipitierten SS<sup>GP-C</sup> zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden quantifiziert. Die zum Zeitpunkt 0 präzipitierte Menge wurde gleich 100% gesetzt und die Mengen zu den Zeitpunkten 3 und 6 auf diesen Wert bezogen.

## Ergebnisse

In Kooperation mit der Forschungsgruppe Marcus Groettrup in St.Gallen (Schweiz) wurde die Maus-Fibroblasten-Zelllinie MC57 mit LCMV infiziert. Nach radioaktiver Markierung von infizierten und nicht-infizierten Zellen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein wurden die Zellen sofort analysiert oder in nicht-radioaktivem Nährmedium für 3 bzw. 6 Stunden weiter kultiviert und anschließend analysiert. Es wurde eine IP unter nativen Bedingungen unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak und eines monoklonalen anti-GP-C-Ak (KL25) durchgeführt, der freundlicherweise von der Forschungsgruppe Groettrup zur Verfügung gestellt wurde.

Wenn die Zellen mit LCMV infiziert werden, können der anti-SS<sub>7</sub>- und der anti-GP-C-Ak zu allen untersuchten Zeitpunkten in ähnlichen Mengen ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa präzipitieren (Abb. 21 A: Spuren 3 bis 8). Dieses Protein ist nicht bei untransfizierten Zellen vorhanden (Spuren 1 und 2). Sowohl der anti-SS<sub>7</sub>- als auch der anti-GP-C-Ak präzipitieren wahrscheinlich das N-glykosylierte pGP-C (g-pGP-C) mit einem errechneten Molekulargewicht von 82 kDa. Die Menge des 80 kDa-Proteins verringert sich nach 3 bzw. 6 Stunden in etwa gleichem Umfang, wenn die IP mit dem anti-SS<sub>7</sub>- oder dem anti-GP-C-Ak durchgeführt wird (Spuren 4 und 5 bzw. 7 und 8). Der anti-GP-C-Ak präzipitiert zu den Zeitpunkten 3 und 6, aber nicht zum Zeitpunkt 0 zwei Proteine mit Molekulargewichten von etwa 50 und 40 kDa (Spuren 3 bis 5). Die errechneten Molekulargewichte für g-GP-1 bzw. g-GP-2 betragen 47 bzw. 35 kDa. Daher könnte es sich bei den präzipitierten Proteinen um g-GP-1 und g-GP-2 handeln. Im Gegensatz dazu sind diese Proteine nicht vorhanden, wenn der anti-SS<sub>7</sub>-Ak verwendet wird (Spuren 6 bis 8).

Damit besitzt das Glykoprotein des LCMV nicht nur nach Transfektion sondern auch nach Infektion die N-terminale SS.

Wenn die MC57-Zellen nicht mit LCMV infiziert werden, kann weder mit dem anti-GP-C- noch mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak ein Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 3 und 12 kDa präzipitiert werden (Abb. 21 B: Spuren 1 bis 6). Nach Infektion der Fibroblasten mit LCMV präzipitiert der anti-SS<sub>7</sub>-Ak hingegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 6 kDa (Spuren 10 bis 12). Bei Verwendung des anti-GP-C-Ak ist eine entsprechende Protein-Bande nicht zu erkennen (Spuren 7 bis 9). Das präzipitierte 6 kDa-Protein entspricht wahrscheinlich der abgespalteten SS (SS<sup>GP-C</sup>).

Die zu den verschiedenen Zeitpunkten präzipitierten Mengen an abgespalteter SS wurden quantifiziert und daraus eine Halbwertszeit der SS<sup>GP-C</sup> von fünf Stunden berechnet (Abb. 21 C). Damit besitzt die abgespaltete SS nicht nur nach Transfektion des pGP-C in HeLa-Zellen sondern auch nach Infektion von MC57-Zellen mit LCMV in Anwesenheit der viralen Proteine eine hohe Stabilität.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die Abspaltung der Signalsequenz von pGP-C

Buchmeier *et al* hatten postuliert, daß es sich bei den ersten 58 Aminosäuren des Glykoproteins pGP-C des lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) um eine Signalsequenz handelt, die im ER abgespaltet wird (Buchmeier und Zinkernagel, 1992). Es wurde aber weder untersucht, ob es sich wirklich um eine Signalsequenz handelt, noch wurde die Abspaltung dieser postulierten Signalsequenz charakterisiert.

Bisher wurde allgemein angenommen, daß SS *in vivo* sehr schnell nach ihrer Abspaltung vom Pre-Protein abgebaut werden. Daher sind zellfreie *in vitro* Systeme verwendet worden, um die Abspaltung von SS zu charakterisieren (Martoglio und Dobberstein, 1998). Für die Untersuchung der SS-Abspaltung vom pGP-C des LCMV wurde ein solches *in vitro* System mit Rauhen Mikrosomen verwendet.

#### 4.1.1 Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C *in vitro*

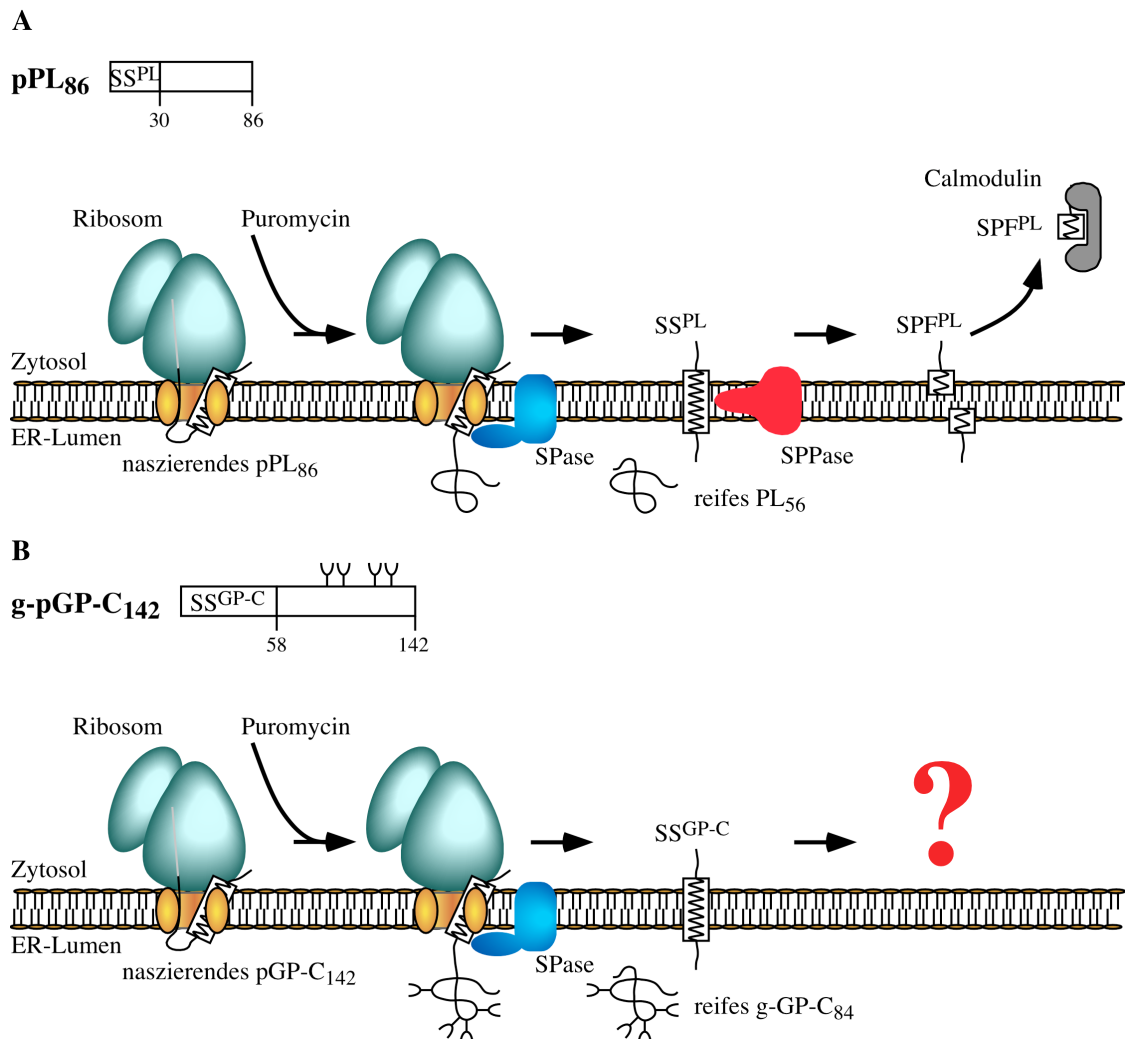
Die SS des pGP-C wird in diesem *in vitro* System in geringen Mengen von einem verkürzten pGP-C-Protein (pGP-C<sub>142</sub>) abgespaltet. Sie vermittelt die Translokation eines Fusionsproteins über die Membran der RM und wird auch von diesem Protein abgespaltet. Damit weist die SS des pGP-C Eigenschaften auf, nach denen SS definiert sind. Die abgespaltete SS scheint außerdem in diesem *in vitro* System stabil zu sein.

Bei der Translation eines verkürzten pGP-C-Proteins (pGP-C<sub>142</sub>) entstehen in dem verwendeten *in vitro* System sehr viele Translationsfragmente mit unterschiedlichen Molekulargewichten (Abb. 7 B).

Da die Molekulargewichte dieser Fragmente in einem Bereich liegen, in dem die durch Signalpeptidase abgespaltete SS (SS<sup>GP-C</sup>) und das reife GP-C<sub>142</sub> erwartet wurden, machen sie den Nachweis einer Abspaltung der SS<sup>GP-C</sup> sehr schwer. Die Menge der Translationsfragmente kann auch durch eine Vielzahl von Optimierungen nicht verringert werden. Dazu zählen die Ermittlung und Verwendung der optimalen Konzentrationen an Salzen, mRNS, SRP und RM sowie der Einsatz von 7-Methyl-Guanosinmonophosphat als Translationsinitiationsinhibitor und die Änderung der Basentriplets, die für die ersten 58 Aminosäuren des pGP-C<sub>142</sub> kodieren (\*pGP-C<sub>142</sub>). Im Gegensatz zum pGP-C<sub>142</sub> entstehen bei der Translation des pPL<sub>86</sub> geringere Mengen von Translationsfragmenten (Abb. 7 A). Dieses Ergebnis stimmt überein mit demjenigen einer früheren Arbeit, in der die Abspaltung der SS des pPL<sub>86</sub> untersucht wurde (Lyko *et al.*, 1995). Daher scheinen die Mengen von Translationsfragmenten im Verhältnis

## Diskussion

zum vollständig translatierten Protein in dem verwendeten zellfreien *in vitro* System vom synthetisierten Protein abhängig zu sein.



**Abb. 22 Abspaltung der Signalsequenz des pPL<sub>86</sub> und pGP-C<sub>142</sub> *in vitro***

Schematische Darstellung der Abspaltung der Signalsequenz des pPL<sub>86</sub> (A) und pGP-C<sub>142</sub> (B) *in vitro*

In Anwesenheit von Rauhen Mikrosomen (RM) werden die naszierenden Proteinketten teilweise durch die Membran der RM transloziert und durch Behandlung mit Puromycin von den Ribosomen entlassen. Dabei werden die verkürzten Proteine vollständig transloziert und die N-terminalen Signalsequenzen sowohl von pPL<sub>86</sub> als auch von pGP-C<sub>142</sub> von den Pre-Proteinen abgespalten. Das pGP-C<sub>142</sub> wird dabei außerdem N-glykosyliert. Die abgespaltene Signalsequenz von pPL<sub>86</sub> wird durch eine postulierte Signalpeptidpeptidase (SPPase) prozessiert und das entstandene N-terminale Signalpeptidfragment (SPF) aus der Membran ins Zytosol entlassen, wo es Kalzium-abhängig an Calmodulin bindet. Im Gegensatz dazu konnte eine Prozessierung der abgespaltenen SS des pGP-C<sub>142</sub> nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Wichtig für die erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung der SS-Abspaltung war die Herstellung eines Antikörpers (anti-SS<sub>7</sub>-Ak), der sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen die hydrophile n-Region der SS<sup>GP-C</sup> immunopräzipitieren kann (Abb. 8 B).

## Diskussion

Aufgrund der Hydrophobizität von Signalsequenzen ist es sehr schwer, Antikörper herzustellen, die gegen eine Signalsequenz gerichtet sind (Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1994). Daher wurden insgesamt drei verschiedene Bereiche innerhalb der SS<sup>GPC</sup> anhand ihres Antigenizitätsindex unter Verwendung des Programms „Lasergene Navigator“ ausgesucht, um anti-Peptid-Antikörper herzustellen. Eines der synthetisierten Peptide enthält die Aminosäure-Sequenz von einem Teil der hydrophilen n-Region (SS<sub>7</sub>). Ein weiteres Peptid wurde so gewählt, daß es dem CTL-Epitop und dessen N-terminal flankierenden Aminosäuren entspricht (SS<sub>30</sub>). Des Weiteren wurde ein Peptid synthetisiert, das Aminosäuren des C-terminalen Bereiches der SS<sup>GPC</sup> enthält (SS<sub>48</sub>). Da die Peptide SS<sub>30</sub> und SS<sub>48</sub> Aminosäure-Sequenzen der sehr hydrophoben h1- bzw. h2-Region enthalten, war es unwahrscheinlich, daß gegen diese Peptide anti-Peptid-Antikörper hergestellt werden würden. Erwartungsgemäß können weder die nach der Immunisierung erhaltenen Seren noch die isolierten anti-SS<sub>30</sub>- und anti-SS<sub>48</sub>-Ak ein *in vitro* translatiertes verkürztes pGP-C immunopräzipitieren. Der hergestellte anti-SS<sub>7</sub>-Ak kann dem gegenüber sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen Proteine präzipitieren, welche die n-Region der SS<sup>GPC</sup> enthalten. Daher können in zukünftigen Arbeiten mit Hilfe dieses Antikörpers wahrscheinlich mögliche wechselwirkende Komponenten isoliert und identifiziert werden.

In isolierten RM kann unter Verwendung dieses anti-SS<sub>7</sub>-Ak sowohl die abgespaltete SS als auch das Pre-Protein pGP-C<sub>142</sub> nachgewiesen werden (Abb. 9). Die SS-Abspaltung erfolgt auch nach Translokation und N-Glykosylierung des Pre-Proteins nicht vollständig (Abb. 11 C). Die resultierende Menge der entstandenen SS<sup>GPC</sup> ist daher sehr gering.

Trotz optimierter Bedingungen wird nur aus etwa 35% der translozierten und N-glykosylierten pGP-C<sub>142</sub>-HA-Proteine die SS abgespaltet. Die Effizienz von Translokation und N-Glykosylierung scheint daher die Menge der abgespalteten SS nicht zu limitieren. Die SS des Glykoproteins gp160 des HIV-1 wird in dem gleichen *in vitro* System ebenfalls nur in geringen Mengen abgespaltet (Martoglio *et al.*, 1997). Im Vergleich dazu beträgt die Effizienz der SS-Abspaltung für transloziertes pPL<sub>86</sub> mehr als 80% (Abb. 7 A), was in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer früheren Arbeit ist (Lyko *et al.*, 1995). Daher scheint die geringe Effizienz der SS-Abspaltung vom pGP-C<sub>142</sub> nicht ein Merkmal des *in vitro* Systems, sondern eine Eigenschaft des pGP-C<sub>142</sub> zu sein.

Die N-terminalen 58 Aminosäuren des pGP-C können die Translokation des Fusionsproteins \*SS<sup>GPC</sup>-PL vermitteln und werden abgespaltet (Abb. 10 B). Bei den ersten 58 Aminosäuren des pGP-C handelt es sich also um eine SS.

Die Abspaltung einer SS hängt nicht nur von Eigenschaften der SS, sondern auch von den Eigenschaften des N-terminalen reifen Anteils des Pre-Proteins ab (Andrews *et al.*, 1988; Russel und Model, 1981). Für das Fusionsprotein \*SS<sup>GPC</sup>-PL erfolgt die SS-Abspaltung wie beim pGP-C<sub>142</sub> nicht vollständig. Die geringe Effizienz der Abspaltung der SS<sup>GPC</sup> scheint also eine spezifische Eigenschaft dieser SS und nahezu unabhängig vom reifen Teil des Pre-Proteins zu sein.

## Diskussion

Innerhalb des untersuchten Zeitraumes wird die SS des pGP-C<sub>142</sub> in dem verwendeten *in vitro* System nach ihrer Abspaltung wahrscheinlich nicht proteolytisch prozessiert. Daher scheint die abgespaltete SS *in vitro* stabil zu sein.

Dies steht im Gegensatz zu den abgespalteten SS des pPL<sub>86</sub> und des gp160, bei denen *in vitro* innerhalb 15 Minuten aus der abgespalteten SS Signalpeptidfragmente freigesetzt werden (Martoglio *et al.*, 1997). Die Stabilität der SS<sup>GP-C</sup> ist also nicht darauf zurückzuführen, daß das *in vitro* System eine abgespaltete SS nicht prozessieren könnte. Die beobachtete Stabilität ist damit eine Eigenschaft der SS<sup>GP-C</sup>.

### 4.1.2 Die Abspaltung der Signalsequenz des pGP-C *in vivo*

Aufgrund der Stabilität der abgespalteten SS im *in vitro* System wurde in dieser Arbeit die Abspaltung der SS des pGP-C zusätzlich *in vivo* untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen transient transfiziert oder MC57-Maus-Fibroblasten mit LCMV infiziert.

Das Glykoprotein des LCMV liegt nicht nur nach Transfektion, sondern auch nach Infektion von Zellen als Pre-Protein pGP-C vor, von dem die SS nicht abgespaltet wurde. Zusätzlich zum pGP-C kann die abgespaltete SS, nicht aber das reife GP-C oder die Prozessierungsprodukte GP-1 und GP-2, nachgewiesen werden. Neben der abgespalteten SS akkumulieren nach Transfektion von Zellen die Pre-Proteine pGP-C und pGP-C-HA und das reife GP-C<sub>362</sub>-HA. Die reifen Proteine GP-C und GP-C-HA und das Pre-Protein pGP-C<sub>362</sub>-HA können hingegen nicht identifiziert werden. Sie werden wahrscheinlich sehr schnell abgebaut.

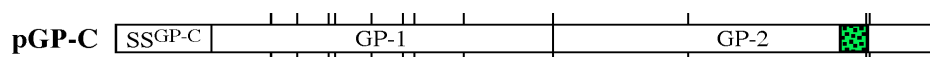
#### 4.1.2.1 Expression verschiedener Formen des pGP-C in HeLa-Zellen

Die Expression der Proteine pGP-C, pGP-C-HA und pGP-C<sub>362</sub>-HA kann nach transients Transfektion der entsprechenden Konstrukte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 12 C und 17 A). Innerhalb sechs Stunden kann kein Anzeichen für eine effiziente Prozessierung der exprimierten Glykoproteine pGP-C bzw. pGP-C-HA in pGP-1 und GP-2 bzw. GP-1 und GP-2-HA beobachtet werden (Abb. 16 A und 17 A). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in dieser Arbeit unwissentlich ein Ursprungs-konstrukt verwendet wurde, das im Vergleich zum sogenannten Wildtyp-Glykoprotein eine Reihe von Mutationen aufweist.

Bisher konnte das LCMV-Glykoprotein in Abwesenheit von weiteren LCMV-Proteinen nur in wenigen Fällen exprimiert werden. Nach Infektion mit einem entsprechend veränderten Baculovirus wird das Glykoprotein in geringen Mengen in Insekten-Zellen synthetisiert (Matsuura *et al.*, 1986). Das in diesen Zellen exprimierte Glykoprotein wird nicht in GP-1 und GP-2 gespalten. Nach Transfektion von Zellen kann das pGP-C außerdem in MC57- und 293T-Zellen exprimiert werden. Bei der Zelllinie MC57 wurden die mit einem Konstrukt für das LCMV-Glykoprotein transfizierten Zellen anschließend auf die Präsentation eines pGP-C-Epitops im Komplex mit MHC I-Molekülen selektioniert (Castelmur *et al.*, 1993). Die Expression des Glykoproteins wurde aber nicht weiter untersucht. Die 293T-Zelllinie

## Diskussion

exprimiert nach Transfektion mit dem sogenannten Wildtyp-Glykoprotein-Konstrukt das pGP-C nicht (Beyer *et al.*, 2001). Nach Einführung einer P110L-Mutation in dieses Konstrukt, wird das Glykoprotein nach Transfektion exprimiert, in GP-1 und wahrscheinlich GP-2 prozessiert und die Prozessierungsprodukte anschließend zur Zell-Oberfläche transportiert. Außerdem kann gezeigt werden, daß sich im pGP-C Mutationen anhäufen, wenn das Virus mehrere Infektionszyklen durchlaufen hat (Beyer *et al.*, 2001). Das ursprünglich von der Forschungsgruppe Zinkernagel in Zürich erhaltene pGP-C-Konstrukt wurde aus dem LCM-Virus erhalten, nachdem es mehrere Infektionszyklen durchlaufen hatte. Somit enthalten alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, die aus diesem Ursprungs-konstrukt hergestellt wurden, im Vergleich zum sogenannten Wildtyp-Glykoprotein eine Reihe von Mutationen. Diese Mutationen könnten erklären, warum das pGP-C nach transients Transfektion von HeLa-Zellen auch nach sechs Stunden nicht in GP-1 und GP-2 gespalten wird.



**Abb. 23 Mutationen innerhalb des pGP-C gegenüber dem Wildtyp-Glykoprotein**

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Aminosäuren von pGP-C (WE) und pGP-C (WE-HPI)

Jeder Strich repräsentiert einen Unterschied in der Aminosäure-Sequenz. Die verschiedenen Aminosäuren sind vom N- zum C-Terminus: WE-HPI (A, L, F, T, H, F, I, A, A, V, L, K) bzw. WE (V, P, L, S, Y, S, M, T, S, L, F, R)

(verändert von: Beyer *et al.*, 2001)

### 4.1.2.2 Membran-Assoziation und intrazellulärer Transport

Die Proteine pGP-C, pGP-C-HA, GP-C<sub>362</sub>-HA und die abgespaltete Signalsequenz können nach radioaktiver Markierung der Zellen nachgewiesen werden und sind mit Membranen assoziiert (Abb. 18 B). Aufgrund der Resistenz gegenüber Endo H scheint ein Anteil des translozierten und N-glykosylierten pGP-C-HA vom ER in den Golgi-Apparat transportiert zu werden, ohne daß zuvor die SS abgespalten wurde (Abb. 14 A und 15). Bei der Transfektion von HeLa-Zellen kann innerhalb sechs Stunden eine effektive Prozessierung des pGP-C-HA nicht beobachtet werden. Dagegen sind nach akuter Infektion die Prozessierungsprodukte GP-1 und GP-2 in den Zellen nachzuweisen.

Das Protein pGP-C besitzt eine C-terminale hydrophobe *trans*-Membran-Region, wodurch es in der Membran verankert ist. Dabei befinden sich der N-Terminus im ER-Lumen und der C-Terminus im Zytosol (Burns und Buchmeier, 1991). Analog dazu befindet sich der C-Terminus des pGP-C-HA ebenfalls auf der zytosolischen Seite der Membran und ist sensitiv gegenüber Proteinase K (Abb. 19 A). Im Vergleich zu pGP-C und pGP-C-HA besitzt das C-terminal verkürzte GP-C<sub>362</sub>-HA diese *trans*-Membran-Region nicht mehr und sollte daher als lösliches Protein vollständig über die ER-Membran ins ER-Lumen transloziert werden. Entgegen dieser Erwartung ist zumindest die HA-Markierung sensitiv gegenüber Proteinase K (Abb. 19 B). Da das reife GP-C<sub>362</sub>-HA in Zellen stabil ist und sich nicht im

## Diskussion

Zytosol befindet, ist ein Abbau durch zelluläre Proteasen einschließlich der Proteasomen unwahrscheinlich. Die Deletion der C-terminalen Aminosäuren in Zusammenhang mit der HA-Markierung könnte vielmehr dazu führen, daß eine andere hydrophobe Region innerhalb des GP-C<sub>362</sub>-HA dieses Protein als Typ I-Membran-Protein in der Membran verankert. Durch Proteinase K könnte die HA-Markierung dann abgebaut werden.

Bei etwa 40% des translozierten und N-glykosylierten (p)GP-C-HA werden innerhalb einer Stunde die Oligosaccharid-Ketten im Golgi-Apparat von der Endo H-sensitiven in eine Endo H-resistente Form prozessiert (Abb. 14 A und B). Die Endo H-resistenten Formen des Glykoproteins werden sowohl mit dem anti-HA- als auch mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak in etwa gleichen Mengen präzipitiert (Abb. 15). Daher scheint der größte Anteil des Glykoproteins den Golgi-Apparat sogar erreicht zu haben, ohne daß es zuvor zu einer SS-Abspaltung gekommen ist (pGP-C-HA).

Da die meisten Proteine für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat 10 bis 30 Minuten benötigen, scheint der Transport des Glykoproteins verzögert zu werden. Ein möglicher Grund dafür könnte in der Abspaltung der SS liegen. Das Glykoprotein gp160 des HIV-1 wird im Vergleich zum LCMV-Glykoprotein nicht aus dem ER transportiert, wenn die SS nicht zuvor abgespalten wurde (Li *et al.*, 1996). Die SS-Abspaltung könnte der auslösende Mechanismus sein, wodurch das gp160 die Kompetenz für den Transport aus dem ER erhält. Dieser mögliche Kontroll-Mechanismus könnte beim LCMV-Glykoprotein lediglich zu einer Verzögerung an Stelle einer Verhinderung des Transportes aus dem ER führen.

Das Glykoprotein wird nach akuter Infektion von Zellen mit LCMV innerhalb 75 bis 90 Minuten im medialen oder *trans*-Golgi-Apparat durch eine zelluläre Protease in GP-1 und GP-2 gespalten (Buchmeier *et al.*, 1987; Harnish *et al.*, 1981; Wright *et al.*, 1990). Aber auch wenn ein pGP-C-Konstrukt mit einer P110-Mutation in 293T-Zellen transfiziert wird, kann das GP-1 auf der Zell-Oberfläche nachgewiesen werden (Beyer *et al.*, 2001). Das in dieser Arbeit verwendete pGP-C-Konstrukt besitzt im Vergleich zum Wildtyp-Glykoprotein diese P110-Mutation zwar nicht, enthält aber eine Reihe anderer Mutationen. Daher könnte die fehlende Prozessierung auf einer veränderten Konformation des Glykoproteins beruhen.

### 4.1.2.3 Abspaltung der Signalsequenz von pGP-C-HA und pGP-C<sub>362</sub>-HA

Das pGP-C-HA liegt in transfizierten HeLa-Zellen als Pre-Protein vor, dessen SS nicht abgespalten wird. Im Gegensatz dazu akkumuliert das reife Protein pGP-C<sub>362</sub>-HA, während das entsprechende Pre-Protein nicht nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich zum pGP-C besitzt das pGP-C-HA ungefähr die gleiche Stabilität und die gleiche Effizienz der SS-Abspaltung. Daher werden diese Eigenschaften nicht oder nur zu einem geringen Teil von der HA-Markierung beeinflusst. Der beobachtete Unterschied in der Abspaltung der SS von pGP-C<sub>362</sub>-HA ist also auf die Deletion der C-terminalen Sequenz des pGP-C zurückzuführen, die auch die *trans*-Membran-Region umfaßt. Diese Verkürzung des Proteins bewirkt, daß die SS des pGP-C<sub>362</sub>-HA wahrscheinlich vollständig und kotranslational



## Diskussion

abgespaltet wird. Für das Glykoprotein US11 des HCMV wurde gezeigt, daß nach Deletion der C-terminalen *trans*-Membran-Region die Abspaltung dessen SS inhibiert wird (Rehm *et al.*, 2001). Die Effizienz der SS-Abspaltung könnte also durch die C-terminale *trans*-Membran-Region des Pre-Proteins beeinflusst werden. Hydrophobe *trans*-Membran-Regionen, die sich innerhalb eines einzigen Proteins oder in verschiedenen Proteinen befinden, können innerhalb der Doppellipid-Schicht von Membranen miteinander wechselwirken. Eine solche Wechselwirkung der hydrophoben Region von SS mit einer C-terminalen *trans*-Membran-Region des Pre-Proteins könnte die Abspaltung der SS beeinflussen.

### 4.1.3 Merkmale der abgespalteten Signalsequenz

Die SS<sup>GP-C</sup> besteht aus 58 Aminosäuren und ist damit sehr viel länger als die meisten SS, die 15 bis 25 Aminosäuren umfassen (Martoglio und Dobberstein, 1998). SS sind allgemein durch eine zentrale hydrophobe (h) Region und flankierende hydrophile Regionen gekennzeichnet. Die N-terminale hydrophile Region der SS<sup>GP-C</sup> umfaßt 17 Aminosäuren, während die C-terminale Region aus 5 Aminosäuren besteht und durch die Spaltungsstelle der Signalpeptidase begrenzt wird. Die h-Region der SS<sup>GP-C</sup> wird durch eine basische Aminosäure in zwei h-Regionen mit 15 bzw. 20 Aminosäuren unterteilt. Die SS<sup>GP-C</sup> enthält das immunodominante CTL-Epitop, das für die Immunantwort des Wirtes sehr wichtig ist (Hudrisier *et al.*, 1997; Klavinskis *et al.*, 1990; Whitton *et al.*, 1988).

#### 4.1.3.1 Stabilität der abgespalteten Signalsequenz unter physiologischen Bedingungen

Die abgespaltete SS ist mit einer Halbwertszeit von etwa 24 Stunden in transfizierten und fünf Stunden in infizierten Zellen überraschend stabil. Außerdem liegt sie im Vergleich zu den Pre-Proteinen nach Transfektion von Zellen in einem dreifachen molaren Überschuß vor. Dieser Überschuß der abgespalteten SS gegenüber dem pGP-C-HA unterstützt die Vermutung, daß die SS vom größeren Anteil des exprimierten und translozierten pGP-C-HA wahrscheinlich kotranslational abgespaltet und das entstandene reife GP-C-HA sofort nach der SS-Abspaltung abgebaut wird.

Die Mengen der abgespalteten SS sind nach Transfektion der Zellen mit dem pGP-C-HA- bzw. dem pGP-C<sub>362</sub>-HA-Konstrukt vergleichbar (Abb. 19). Die Stabilität der abgespalteten SS ist also wahrscheinlich nicht abhängig von einer möglichen Wechselwirkung ihrer hydrophoben Regionen mit der C-terminalen *trans*-Membran-Region des pGP-C-HA.

Bisher war allgemein davon ausgegangen worden, daß SS sofort nach ihrer Abspaltung vom Pre-Protein abgebaut werden. Unter physiologischen Bedingungen konnten abgespaltete SS von Pre-Proteinen nämlich in höheren Eukaryontenzellen bisher nicht nachgewiesen werden. Daher ist die beobachtete hohe Stabilität der abgespalteten SS des pGP-C sehr ungewöhnlich.

## Diskussion

Eine mögliche proteolytische Prozessierung der abgespalteten SS kann *in vitro* anhand von definierten Protein-Banden mit Molekulargewichten um etwa 3 kDa beobachtet werden, die den N-Terminus der SS<sup>GP-C</sup> besitzen. *In vivo* kann diese Beobachtung aber nicht bestätigt werden, weshalb die nieder-molekularen Proteine vielleicht keine physiologische Relevanz besitzen.

Die abgespaltete SS ist außerdem mit Membranen assoziiert. Wenn abgespaltete SS nicht abgebaut werden, sondern in der Membran akkumulieren, könnten sie die Stabilität und Struktur dieser Membranen beeinflussen (Batenburg *et al.*, 1988a; Batenburg *et al.*, 1988b; Briggs und Gierasch, 1984). Dies weist darauf hin, daß die SS<sup>GP-C</sup> einen wichtige Einfluß, beispielsweise auf Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der Membranen und damit direkt oder indirekt auf die Virus-Vermehrung, ausüben könnte. Eine mögliche Funktion der SS<sup>GP-C</sup> ist daher wahrscheinlich auf ihre außergewöhnliche Stabilität und der Akkumulation in der Membran zurückzuführen.

### 4.1.3.2 Stabilität der abgespalteten Signalsequenz gegenüber Protease-Verdau

Die abgespaltete SS ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Membranen assoziiert und wahrscheinlich in diese inseriert. Sie wird nicht durch Proteinase K abgebaut, auch wenn die Membranen zuvor unter nativen Bedingungen mit nicht-ionischen Detergentien aufgelöst wurden. Der Schutz der abgespalteten SS gegenüber Proteinase K ist also unabhängig von intakten Membranen. Die abgespaltete SS scheint eine kompakte Konformation zu besitzen, die verhindert, daß sie durch Proteinase K abgebaut wird.

Proteinase K spaltet Peptidbindungen mit einer geringen Spezifität, so daß N-terminal zu allen hydrophoben und aromatischen Aminosäuren eine Spaltung stattfinden kann. Dadurch werden die meisten Proteine, die für Proteinase K zugänglich sind, zu sehr kleinen Peptidfragmenten abgebaut. Der Zugang der Protease zum Protein kann dadurch verhindert werden, daß das Protein in einer Membran inseriert ist, ohne eine längere Sequenz außerhalb der Membran zu exponieren. Außerdem werden Proteine nicht abgebaut, wenn sie vollständig über eine Membran transloziert wurden und sich anschließend in einem durch Membranen begrenzten Kompartiment wie zum Beispiel dem ER befinden.

Das pGP-C<sub>142</sub> wird durch Proteinase K nicht vollständig, sondern nur zu einem 6 kDa-Protein abgebaut, auch wenn es nicht mit Membranen assoziiert ist und daher nicht durch diese geschützt werden kann (Abb. 9, Spur 2). Dieses 6 kDa-Protein wird durch den anti-SS<sub>7</sub>-Ak präzipitiert, besitzt somit den N-Terminus des pGP-C<sub>142</sub> und könnte wie die abgespaltete SS aus den Aminosäuren 1 bis 58 bestehen. Daher ist nicht nur die abgespaltete SS, sondern auch die SS als Teil des Pre-Proteins pGP-C<sub>142</sub> stabil gegenüber Proteinase K.

Die SS könnte eine kompakte Konformation einnehmen, so daß Proteinase K keine Peptidbindung spalten kann. Ein Beispiel für einen solchen Schutz, der von der Konformation des Proteins abhängt, ist das Prion-Protein (Pr). Das Prion-Protein ist in der normalen Form Pr<sup>c</sup> sensitiv, die pathogene Form Pr<sup>sc</sup> aber resistent gegenüber Proteinase K-Verdau (McKinley

## Diskussion

*et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1986). Der Unterschied zwischen diesen beiden Formen liegt nicht in der Aminosäure-Sequenz, sondern in einer unterschiedlichen Konformation (Masel und Jansen, 1999).

SS beeinflussen die Konformation von Polypeptiden, was sich in der Sensitivität gegenüber Proteasen, in der Amphiphilität oder in Unterschieden in der spezifischen katalytischen Aktivität widerspiegelt (Dierstein und Wickner, 1985; Roggenkamp *et al.*, 1985). Wahrscheinlich kann umgekehrt auch der reife Teil eines Pre-Proteins die Konformation der SS verändern. Die Resistenz des 6 kDa-Proteins gegenüber Proteinase K könnte daher auf einer spezifischen Konformation beruhen, die der N-terminale Teil des pGP-C<sub>142</sub> einnimmt. Nach erfolgter SS-Abspaltung könnte die abgespaltete SS diese Konformation beibehalten und dadurch selbst gegenüber Proteinase K resistent sein.

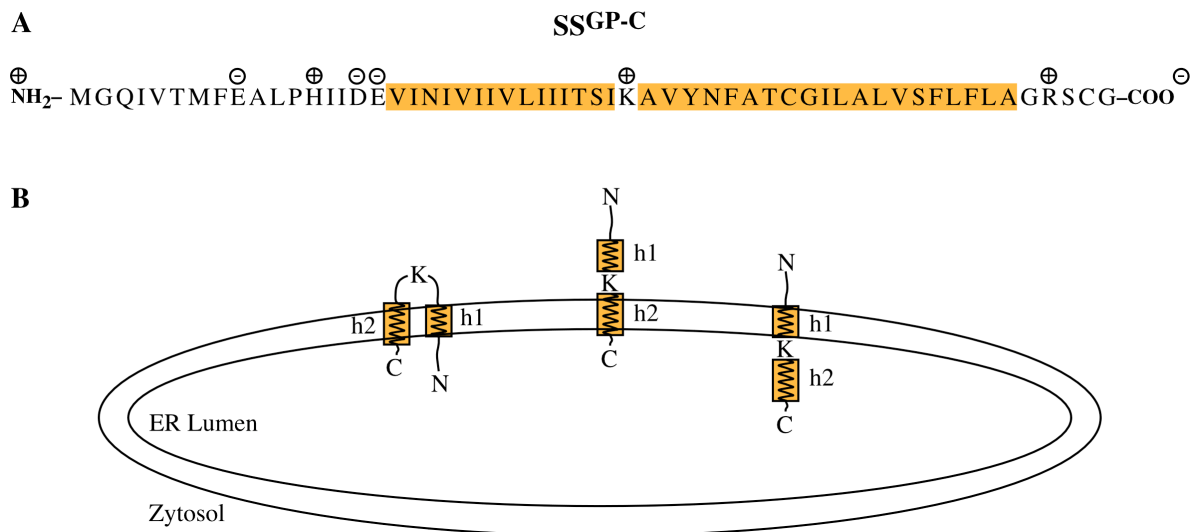
Im Vergleich zum pGP-C<sub>142</sub> wird das Fusionsprotein \*SS<sup>GP-C</sup>-PL vollständig durch Proteinase K abgebaut, wenn es nicht durch Membranen geschützt ist. Daher scheint die Konformation des N-terminalen Teils des \*SS<sup>GP-C</sup>-PL im Vergleich zum pGP-C<sub>142</sub> unterschiedlich zu sein und deshalb das \*SS<sup>GP-C</sup>-PL vollständig durch Proteinase K abgebaut zu werden. Neben einer bestimmten Konformation des N-terminalen Teils im pGP-C<sub>142</sub> könnte eine Wechselwirkung der SS mit einem Proteinase K-resistenten Protein den Zugang zur SS verhindern und somit einen Schutz vermitteln. Wahrscheinlich ist diese Wechselwirkung ebenfalls vom reifen Teil des Proteins abhängig. Diese Möglichkeit wird dadurch unterstützt, daß die abgespaltete SS durch Proteinase K abgebaut wird, wenn durch Behandlung mit SDS nicht nur die Membran aufgelöst, sondern auch Proteine denaturiert werden. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß die hydrophoben Regionen der abgespalteten SS innerhalb der Membranen oligomerisieren und damit eine Resistenz gegenüber Proteinase K erreicht wird.

### 4.1.3.3 Mögliche Topologien der abgespalteten Signalsequenz innerhalb der ER-Membran

Die abgespaltete SS des pGP-C ist mit 58 Aminosäuren sehr lang und besitzt zwei hydrophobe Regionen, über die sie in der Membran verankert sein könnte (Abb. 24). Die Proteinase K-Resistenz der abgespalteten SS erlaubt es nicht, Regionen der SS anhand der Sensitivität gegenüber dieser Protease zu identifizieren, die auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exponiert und damit zugänglich für die Protease sind. Da die SS<sup>GP-C</sup> zwei hydrophobe Regionen besitzt, könnte sie die Membran entweder einmal oder zweimal durchspannen. Die Resistenz gegenüber Proteinase K und theoretische Argumente sprechen dafür, daß beide h-Regionen in der Membran inseriert sind, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der luminalen Seite der Membran exponiert sind.

Es wird angenommen, daß SS während der Translokation über bzw. in die ER-Membran in Form einer Haarnadel in die Membran inseriert werden (Shaw *et al.*, 1988). Nach einer erfolgten Abspaltung der SS vom Pre-Protein durch die Signalpeptidase ist der C-Terminus der SS auf der luminalen und der N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exponiert.

## Diskussion



**Abb. 24 Mögliche Topologien der abgespalteten Signalsequenz innerhalb der ER-Membran**

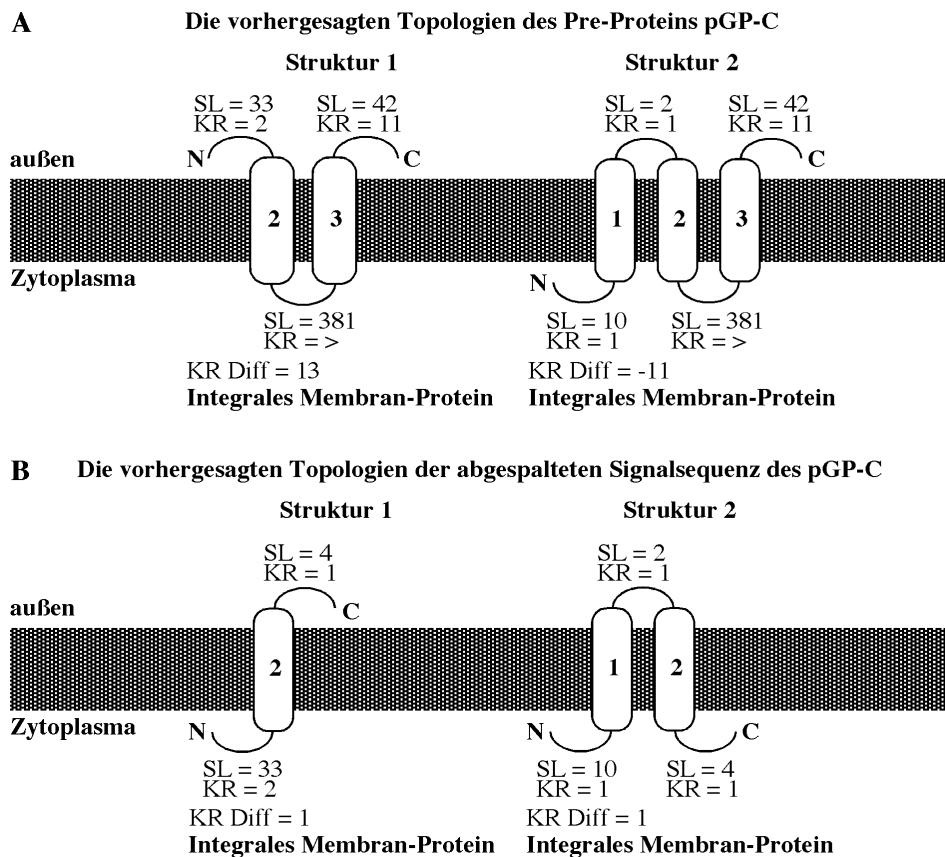
A.) Schematische Darstellung der Sequenz der n-, h1-, h2- und c-Region der Signalsequenz des pGP-C

B.) Die abgespaltete Signalsequenz in der ER-Membran

Segmente von Proteinen können in hydrophoben Membranen inseriert sein, wenn die Aminosäuren der Membran-durchspannenden Region ebenfalls hydrophob sind. Für die Vorhersage von Membran-Regionen werden den verschiedenen Aminosäuren Zahlenwerte zugeordnet, die ihrer relativen Hydrophobizität entsprechen (Eisenberg *et al.*, 1984). Dabei erhalten sehr hydrophobe Aminosäuren hohe positive (maximal 1,38) und geladene Aminosäuren negative Werte (minimal -2,53). Die Werte aller Aminosäuren wurden normalisiert, so daß ein Mittelwert von Null und eine Standardabweichung von 1,00 entstehen. Segmente von jeweils 21 Aminosäuren, die einen durchschnittlichen Hydrophobizitätswert von weniger als 0,42 pro AS besitzen, werden als nicht-*trans*-Membran-Region bezeichnet. Die SS des pPL befindet sich nach deren Abspaltung vom Pre-Protein mit ihrer hydrophoben Region innerhalb der Membran (Lyko *et al.*, 1995). Der errechnete Wert für die 12 Aminosäuren der h-Region dieser SS beträgt 9,68 (Durchschnitt pro AS: 0,81). Im Vergleich dazu wird ein Wert für die h1- bzw. h2-Region der SS<sup>GPC</sup> von 14,33 bzw. 13,85 berechnet (Durchschnitt pro AS: 0,96 (15 AS) bzw. 0,69 (20 AS)). Viele Membran-assoziierte Proteine enthalten hydrophobe Segmente von 18 bis 24 Aminosäuren, die wahrscheinlich Membran-inserierte  $\alpha$ -Helices bilden (Argos *et al.*, 1982; Engelmann und Steitz, 1981; Kyte und Doolittle, 1982). Ein Segment von 21 Aminosäuren, das als  $\alpha$ -Helix vorliegt, entspricht in etwa der Dicke des apolaren Teils der Lipiddoppelschicht. Eine *trans*-Membran-Region muß aber nicht den apolaren Teil der Lipiddoppelschicht vollständig als  $\alpha$ -Helix durchqueren. Da die 12 Aminosäuren der h-Region der pPL-Signalsequenz ausreichend sind, die abgespaltete SS in der Membran zu verankern, könnten sowohl die h1- als auch die h2-Region der SS<sup>GPC</sup> in der Membran inseriert sein. Die h2-Region könnte danach die Membran vollständig als  $\alpha$ -Helix durchspannen.

## Diskussion

Die Orientierung von Proteinen innerhalb Membranen wird neben den hydrophoben Regionen auch durch deren flankierende Aminosäuren beeinflusst. Die meisten untersuchten *trans*-Membranproteine weisen in ihrem zytoplasmatischen Segment eine positive Gesamtladung auf (von Heijne, 1986a). Die Aktivierungsenergie für die Translokation von basischen Aminosäuren über die ER-Membran ist größer als die für saure Aminosäuren (Weinstein und Klausner, 1982). Außerdem deutet die Thermodynamik von Membranen darauf hin, daß negativ geladene Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der zytosolischen Membran-Seite abgestoßen werden sollten. Die Abstoßung zwischen negativ geladenen Aminosäuren in der n-Region der SS und den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide sollte nämlich energiereich und damit thermodynamisch ungünstig sein.



**Abb. 25 Vorhergesagte Membran-Topologien von pGP-C und abgespalteter Signalsequenz**

Schematische Darstellung der vorhergesagten Topologien

Das Programm TopPredII wurde verwendet, um die möglichen Topologien des pGP-C (A) und der abgespalteten SS (B) innerhalb einer Membran vorherzusagen.

A.) Beide vorhergesagten Strukturen stimmen mit den Ergebnissen vorheriger Arbeiten überein, nachdem das pGP-C eine C-terminale *trans*-Membran-Region besitzt und der C-Terminus dem Zytosol zugewandt ist. Im Unterschied zur Struktur 1 durchspannen die ersten 58 Aminosäuren die Membran in der Struktur 2 mit beiden h-Regionen.

B.) Im Unterschied zur Struktur 1 durchspannt die abgespaltete Signalsequenz die Membran in der Struktur 2 mit beiden h-Regionen. Die Struktur 2 stimmt aber nicht mit der erwarteten Topologie überein, da die Abspaltung der Signalsequenz auf der luminalen Seite der Membran erfolgt und daher der C-Terminus der abgespalteten Signalsequenz ebenfalls im Lumen sein sollte.

> : zu lang, um signifikant zu sein; < : zu kurz, um signifikant zu sein; SL: Schleifenlänge [AS]; KR: Zahl der Lys und Arg; KR Diff: positive Ladungsdifferenz

## Diskussion

Die Topologie von Proteinen innerhalb Membranen kann aufgrund der vorhandenen hydrophoben Regionen und deren flankierenden Aminosäuren einschließlich der gegebenen Gesamtladungen vorhergesagt werden (Sipos und von Heijne, 1993). Das entsprechende Rechner-Programm ProtPredII sagt für das pGP-C und die abgespaltete SS zwei mögliche Topologien voraus (Abb. 25). Beide Topologien des pGP-C stimmen mit der Beobachtung überein, daß die SS normalerweise während der Translokation des Pre-Proteins in einer Haarnadel-ähnlichen Form in die Membran inseriert wird, wobei der positiv geladene N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite und die SPase-Spaltungsstelle nahe an der luminalen Seite der Membran positioniert sind (Kuhn, 1987; Shaw *et al.*, 1988).

Die n-Region der SS<sup>GP-C</sup> besitzt eine negative und das Segment N-terminal zur h2-Region keine Gesamtladung. Wenn die abgespaltete SS die Membran zweimal durchspannt, befindet sich dadurch die negativ geladene n-Region auf der luminalen Seite. Auf der zytoplasmatischen Seite der Membran liegt dann die positive Aminosäure, welche die beiden h-Regionen voneinander trennt. Diese Topologie stimmt überein mit der Annahme, daß der N-Terminus einer SS, der sich auf der zytosolischen Seite der Membran befindet und eine negative Gesamtladung besitzt, sich spontan durch diese hindurch auf deren luminalen Seite drehen kann (von Heijne, 1986d).

Neben den vorhergesagten zwei statischen könnte es aber auch eine dynamische Verankerung der SS geben. Bei dieser dynamischen Verankerung könnten zu verschiedenen Zeitpunkten entweder die h2-Region als einzige die Membran durchspannen oder sowohl die h1- als auch die h2-Region in der Membran inseriert sein.

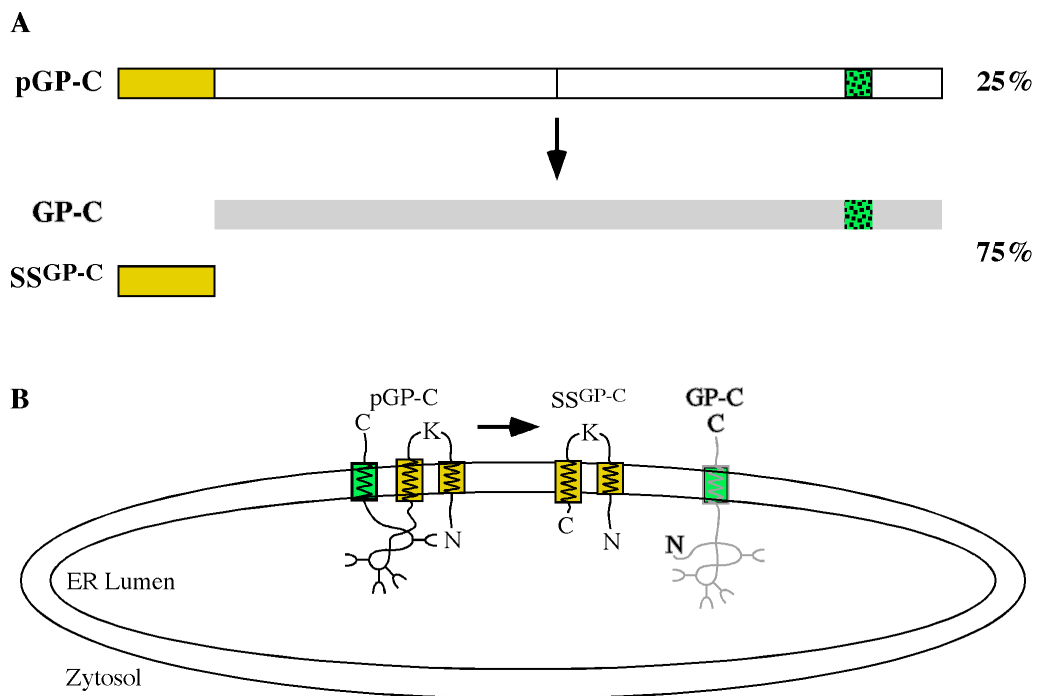
## 4.2 Mögliche Bedeutung der Signalsequenz des pGP-C für LCMV

Bei der Infektion von Zellen scheint vom überwiegenden Anteil des translozierten pGP-C die SS kotranslational abgespaltet zu werden. Diese abgespaltete SS besitzt eine ungewöhnlich hohe Stabilität. Die Frage stellt sich, welche Bedeutung die Effizienz der SS-Abspaltung und die lange Halbwertszeit der abgespalteten SS für das LCMV-Virus haben könnten.

### 4.2.1 Regulation der Signalsequenz-Abspaltung von pGP-C

Die Effizienz der SS-Abspaltung könnte in infizierten Zellen den Transport von pGP-C bzw. GP-C entlang des Sekretorischen Weges und den Abbau dieser beiden Formen beeinflussen. Bei einer akuten Infektion mit LCMV kann das GP-1 im Komplex mit GP-2 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Burns und Buchmeier, 1991; Oldstone und Buchmeier, 1982). Im Gegensatz dazu erscheint das GP-1 bei einer persistenten Infektion, die aus einer akuten Infektion nach vielen Vermehrungszyklen des Virus entstehen kann, nicht auf der Plasmamembran (Oldstone und Buchmeier, 1982).

## Diskussion



**Abb. 26 Die Proteine pGP-C, GP-C und SS<sup>GPC</sup> im ER**

Schematische Darstellung des Glykoproteins im ER vor und nach erfolgter Abspaltung der Signalsequenz

A.) Die relativen molaren Mengen der immunopräzipitierten Proteine (Pre-Protein pGP-C, abgespaltete SS und reifes GP-C) in Prozent

B.) Postulierte Verankerung von pGP-C und SS<sup>GPC</sup> in der ER-Membran

In akut infizierten Zellen wird ausschließlich das Pre-Protein pGP-C, nicht aber das reife Protein GP-C gefunden (Abb. 21 A). Das pGP-C scheint nach einer erfolgten SS-Abspaltung sehr schnell in GP-1 und GP-2 prozessiert zu werden, da das GP-1 die SS nicht mehr besitzt (Buchmeier und Zinkernagel, 1992). Die Prozessierung in GP-1 und GP-2 scheint daher abhängig von einer erfolgreichen SS-Abspaltung zu sein. In einer persistenten Infektion, die aus einer akuten Infektion entstehen kann, könnte die Abspaltung der SS vom pGP-C im Vergleich dazu inhibiert werden. Die SPase-vermittelte Abspaltung einer SS kann von deren Position innerhalb der Membran abhängig sein, wie es für die SS-Abspaltung innerhalb des strukturellen Polyproteins des Flavivirus diskutiert wurde (Stocks und Lobigs, 1998). Eine Inhibition der SS-Abspaltung könnte also auf einer unterschiedlichen Verankerung der SS in der Membran beruhen (vgl. Abb. 24).

Im Glykoprotein akkumulieren nach vielen Vermehrungszyklen des Virus Mutationen (Beyer *et al.*, 2001). Diese Mutationen könnten dazu führen, daß die SS nicht abgespaltet werden kann und damit das Glykoprotein nicht in GP-1 und GP-2 prozessiert wird (Matloubian *et al.*, 1990; Salvato *et al.*, 1991). Das pGP-C wird statt dessen wahrscheinlich abgebaut.

Da das reife GP-C nicht nachgewiesen werden kann, wird es vermutlich direkt nach der SS-Abspaltung abgebaut. Durch die Verwendung des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin könnte der Abbau verhindert und das GP-C dadurch nachgewiesen werden.

## Diskussion

Das pGP-C und die abgespaltete SS könnten einen Einfluß darauf haben, wie die Infektion verläuft. Daher sollte in einer zukünftigen Arbeit untersucht werden, welche Veränderungen beim Übergang von einer akuten zu einer persistenten Infektion auftreten. Die Stabilität dieser Proteine könnte dabei durch Immunopräzipitationen und die intrazelluläre Lokalisierung durch Immunofluoreszenzen unter beiden Infektionsbedingungen untersucht werden.

Bisher konnte die abgespaltete SS nicht im Virus nachgewiesen werden, da kein Antikörper vorhanden war, der die SS spezifisch präzipitiert. Unter Verwendung des anti-SS<sub>7</sub>-Ak kann der Frage nachgegangen werden, ob die abgespaltete SS im Virus oder in defekten interferierenden Partikeln vorhanden ist.

### 4.2.2 Stabilität der SS<sup>GPC</sup> und Präsentation des CTL-Epitops auf der Zelloberfläche

Die hohe Stabilität der abgespalteten SS könnte sich auf die Freisetzung des immunodominanten CTL-Epitops gp33 auswirken, das sich innerhalb der SS befindet (Aminosäuren 33 bzw. 34 bis 43) (Hudrisier *et al.*, 1997; Klavinskis *et al.*, 1990; Pircher *et al.*, 1990). Der Abbau der abgespalteten SS könnte abhängig vom infizierten Zelltyp reguliert sein. In infizierten Mäusen werden neben vielen anderen Zelltypen bevorzugt diejenigen B-Zellen vom LCMV infiziert, die neutralisierende Antikörper gegen GP-1 bilden (Planz *et al.*, 1996). In diesen B-Zellen könnte die abgespaltete SS instabil sein und schnell durch Proteasomen abgebaut werden (Gallimore *et al.*, 1998). Die aus diesem Abbau entstandenen Peptide, die auch das CTL-Epitop enthalten, werden dann durch TAP ins ER transportiert (Hombach *et al.*, 1995). Das CTL-Epitop kann anschließend im Komplex mit MHC I-Molekülen zur Plasmamembran transportiert und dort den CTL präsentiert werden (Whitton und Oldstone, 1989). Eine schnell abgebaute SS<sup>GPC</sup> in infizierten B-Zellen, die neutralisierende Antikörper produzieren, könnte zu einer frühen Lyse dieser Zellen und damit zu einer reduzierten Antikörper-vermittelten Immunantwort führen.

Bei einer hohen Stabilität der SS<sup>GPC</sup> wie in infizierten MC57-Fibroblasten-Zellen (vgl. Abb. 21 B) wird das gp33-Epitop wahrscheinlich in geringeren Mengen freigesetzt. Dadurch können weniger gp33-Peptide an MHC I-Moleküle binden, präsentiert werden und CTL stimulieren. Bei einer Inhibition des Abbaus der abgespalteten SS könnten infizierte Zellen also in geringerer Anzahl von den CTL lysiert werden. Außerdem wären weniger neutralisierende Antikörper zur Verhinderung der Infektion von neuen Zellen mit dem Virus vorhanden. Dies würde sich wahrscheinlich in einer hohen Vermehrungsrate des Virus äußern, da es in diesen Zellen mehr Zeit für die Synthese seiner Proteine und die Bildung neuer Viren hätte.

Die Stabilität der abgespalteten SS muß einer Regulation unterliegen, falls sie in unterschiedlichen Zelltypen verschieden sein sollte. Diese mögliche Regulation könnte durch Wechselwirkungen der abgespalteten SS mit anderen Komponenten erfolgen. Diese Wechselwirkung kann durch den Vergleich von Immunopräzipitationen unter nativen und denaturierenden Bedingungen mit dem anti-SS<sub>7</sub>-Ak untersucht werden. Falls eine solche Wechselwirkung nicht stabil ist oder nur für kurze Zeit auftritt, können auch



## Diskussion

---

Kreuzvernetzungsexperimente durchgeführt und die entstandenen Produkte mit dem Antikörper isoliert werden. In Verbindung mit der Massenspektroskopie ist es wahrscheinlich möglich, eine wechselwirkende Komponente anschließend zu identifizieren.

Die abgespaltete SS könnte einen Einfluß auf die Biosynthese des pGP-C und dessen Faltung besitzen. Um eine solche Funktion der SS zu untersuchen, sollten Glykoproteine hergestellt werden, bei denen die SS<sup>GPC</sup> mutiert oder teilweise deletiert ist. Zusätzlich sollten Fusionsproteine synthetisiert werden, bei denen die gesamte SS<sup>GPC</sup> durch eine andere SS ersetzt ist. Dafür ist ein Expressionsvektor nötig, der die kodierenden Regionen für sämtliche Proteine des LCMV mit Ausnahme des pGP-C enthält. Durch Kotransfektion der cDNS des Fusionsproteins und diesem Vektor in Zellen kann der Einfluß der SS<sup>GPC</sup> auf die Virus-Vermehrung charakterisiert werden. Durch solche Experimente kann ebenso die Bedeutung der Stabilität der SS auf die Freisetzung des CTL-Epitops untersucht werden.

Die SS des pGP-C ist bisher die einzige SS, bei der in eukaryontischen Zellen eine hohe Stabilität nach deren Abspaltung vom Pre-Protein gezeigt wurde. Daher wäre es für die therapeutische Behandlung von LCMV- oder anderen viral infizierten Patienten sehr wichtig herauszufinden, ob der Abbau der abgespalteten SS und damit wahrscheinlich die Lyse der infizierten Zellen durch CTL stimuliert werden können. Dies eröffnet vielleicht einen generellen Weg, wie virale Infektionen spezifisch bekämpft werden können.

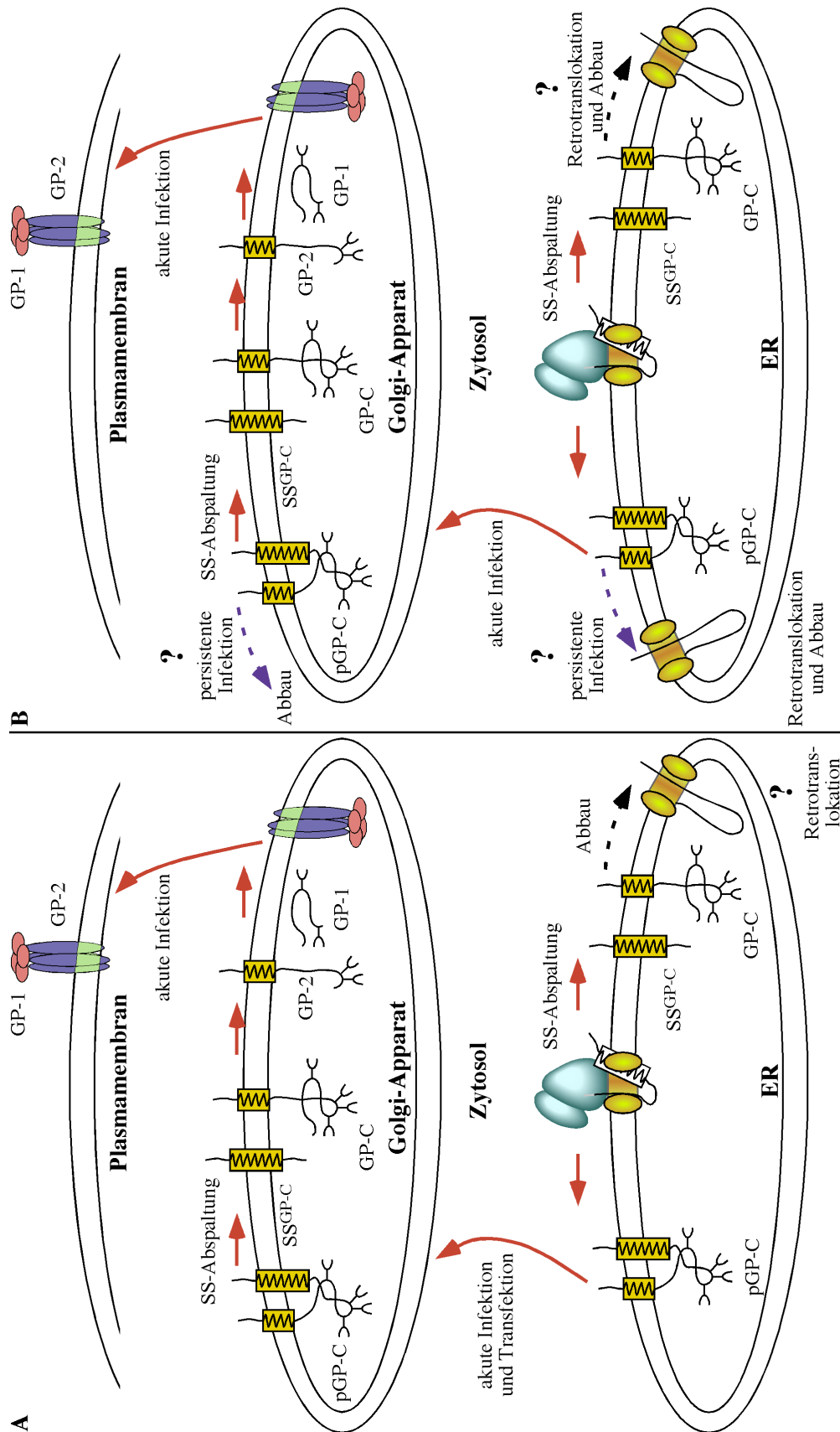


Abb. 27 Schematische Darstellung der Prozessierungen und des intrazellulären Transportes

A.) Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse  
Im Unterschied zur Transfektion konnte bei der Infektion von Zellen die Prozessierung des LCMV-Glykoproteins in GP-1 und GP-2 und deren Transport zur Plasmamembran nachgewiesen werden. Unter beiden Bedingungen kann nur das Pre-Protein pGP-C, aber nicht das reife GP-C beobachtet werden.  
B.) Modell der möglichen Prozessierung und des Transportes dieser Proteine unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Arbeiten  
Abhängig von der Art der LCMV-Infektion könnten die einzelnen Proteine unterschiedlich prozessiert und in verschiedene Kompartimente innerhalb der Zelle transportiert werden.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glykoprotein pGP-C des lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) wird als Vorläufer-Protein synthetisiert und in akut infizierten Zellen entlang des Sekretorischen Weges transportiert. Auf seinem Weg zur Plasmamembran wird es proteolytisch in GP-1 und GP-2 gespalten, wobei das GP-1 mit der Aminosäure 59 des primären Translationsproduktes beginnt. Daher wurde postuliert, daß es sich bei den Aminosäuren 1 bis 58 um eine Signalsequenz (SS) handelt, die im ER abgespalten wird. Bisher wurde aber weder diese postulierte Signalsequenz noch deren Abspaltung vom pGP-C charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde die Abspaltung der postulierten SS des pGP-C ( $SS^{GP-C}$ ) in einem zellfreien *in vitro* Translations-/Translokationssystem untersucht. Mit einem zuvor hergestellten anti-Peptid-Antikörper, der die  $SS^{GP-C}$  sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert, konnte die Abspaltung der  $SS^{GP-C}$  von einem verkürzten pGP-C nachgewiesen werden. Die  $SS^{GP-C}$  vermittelt die Translokation eines Fusionsproteins über die ER-Membran und wird abgespalten. Somit besitzt die postulierte  $SS^{GP-C}$  Eigenschaften, nach denen Signalsequenzen definiert sind. Die Menge der abgespaltenen SS war sowohl unter Verwendung des verkürzten pGP-C als auch des Fusionsproteins sehr gering. Die  $SS^{GP-C}$  erwies sich in diesem *in vitro* System als überraschend stabil und wurde nicht in kurzer Zeit proteolytisch prozessiert.

Die Abspaltung der  $SS^{GP-C}$  wurde weiterhin *in vivo* sowohl nach Transfektion als auch nach Infektion von kultivierten Zellen untersucht. Neben dem Pre-Protein pGP-C konnte die abgespaltene SS in großen Mengen nachgewiesen werden. Daher erfolgte die Abspaltung der SS *in vivo* nicht vollständig, aber zum überwiegenden Teil wahrscheinlich kotranslational. Sowohl das pGP-C als auch die  $SS^{GP-C}$  waren mit Membranen der Zelle assoziiert. Die ungewöhnliche Stabilität der abgespaltenen SS gegenüber Proteasen weist darauf hin, daß beide hydrophoben Regionen der  $SS^{GP-C}$  in der Membran verankert sind. Die  $SS^{GP-C}$  ist selbst nach Auflösung der Membranen unter nativen Bedingungen resistent gegenüber Proteasen, weshalb diese hydrophoben Regionen wahrscheinlich eine äußerst stabile Konformation einnehmen. Außerdem scheint eine mögliche Wechselwirkung der  $SS^{GP-C}$  im Pre-Protein mit der C-terminalen *trans*-Membran-Region des pGP-C die Effizienz der SS-Abspaltung zu beeinflussen.

Durch diese Arbeit wurden die Voraussetzungen geschaffen, die Bedeutung der abgespaltenen SS und des pGP-C zu charakterisieren. Bisher wurde allgemein angenommen, daß SS sehr schnell nach ihrer Abspaltung vom Pre-Protein abgebaut werden. Dennoch besitzen die abgespaltene SS und das Pre-Protein sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von weiteren viralen Proteinen eine ungewöhnlich hohe Stabilität. Die möglichen wichtigen Funktionen des Pre-Proteins pGP-C und der abgespaltenen SS für die Virus-Vermehrung wurden diskutiert.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ainger, K. J., and Meyer, D. I. (1986). Translocation of nascent secretory proteins across membranes can occur late in translation. *EMBO J*, **5**, 951-955.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, VCH.
- An, F. Y., Sulavik, M. C., and Clewell, D. B. (1999). Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol* **181**, 5915-21.
- Andrews, D. W., Perara, E., Lesser, C., and Lingappa, V. R. (1988). Sequences beyond the cleavage site influence signal peptide function. *J Biol Chem* **263**, 15791-8.
- Annaert, W., and De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci* **22**, 439-43.
- Argos, P., Rao, J. K., and Hargrave, P. A. (1982). Structural prediction of membrane-bound proteins. *Eur J Biochem* **128**, 565-75.
- Attardi, G., and Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 289-333.
- Baker, A., and Schatz, G. (1987). Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3117-21.
- Batenburg, A. M., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M., van Scharrenburg, G. J., Slotboom, A. J., Demel, R. A., and de Kruijff, B. (1988a). Characterization of the interfacial behavior and structure of the signal sequence of *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *J Biol Chem* **263**, 4202-7.
- Batenburg, A. M., Demel, R. A., Verkleij, A. J., and de Kruijff, B. (1988b). Penetration of the signal sequence of *Escherichia coli* PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alterations of lipid organization. *Biochemistry* **27**, 5678-85.
- Belin, D., Bost, S., Vassalli, J.-D., and Strub, K. (1996). A two step recognition of signal sequences determines the translocation efficiency of proteins. *EMBO J*, **15**, 468-478.
- Bellion, E., and Goodman, J. M. (1987). Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein. *Cell* **48**, 165-73.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**, 393-404.
- Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**, 260-74.
- Beyer, W. R., Miletic, H., Ostertag, W., and von Laer, D. (2001). Recombinant expression of lymphocytic choriomeningitis virus strain WE glycoproteins: a single amino acid makes the difference. *J Virol* **75**, 1061-4.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1496-500.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**, 852-62.
- Bohni, P. C., Deshaies, R. J., and Schekman, R. W. (1988). SEC11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J Cell Biol* **106**, 1035-42.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E., and Brooks, A. G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* **187**, 813-8.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-9.
- Briggs, M. S., and Gierasch, L. M. (1984). Exploring the conformational roles of signal sequences: synthesis and conformational analysis of lambda receptor protein wild-type and mutant signal peptides. *Biochemistry* **23**, 3111-4.

## Literaturverzeichnis

- Briggs, M. S., Gierasch, L. M., Zlotnick, A., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (1985). *In vivo* function and membrane binding properties are correlated for *Escherichia coli* lamB signal peptides. *Science* **228**, 1096-9.
- Brink, S., Flugge, U. I., Chaumont, F., Boutry, M., Emmermann, M., Schmitz, U., Becker, K., and Pfanner, N. (1994). Preproteins of chloroplast envelope inner membrane contain targeting information for receptor-dependent import into fungal mitochondria. *J Biol Chem* **269**, 16478-85.
- Brodsky, J. L., and Schekman, R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**, 1355-63.
- Brooks, A. G., Borrego, F., Posch, P. E., Patamawenu, A., Scorzelli, C. J., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., and Coligan, J. E. (1999). Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* **162**, 305-13.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-8.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-8.
- Brunt, L. M., Portnoy, D. A., and Unanue, E. R. (1990). Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* **145**, 3540-6.
- Buchmeier, M. J., Elder, J. H., and Oldstone, M. B. (1978). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identification of the virus structural and cell associated polypeptides. *Virology* **89**, 133-45.
- Buchmeier, M. J., and Oldstone, M. B. (1979). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides. *Virology* **99**, 111-20.
- Buchmeier, M. J., and Parekh, B. S. (1987). Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **133**, 41-57.
- Buchmeier, M. J., Southern, P. J., Parekh, B. S., Wooddell, M. K., and Oldstone, M. B. (1987). Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins. *J Virol* **61**, 982-5.
- Buchmeier, M. J., and Zinkernagel, R. M. (1992). Immunodominant T cell epitope from signal sequence. *Science* **257**, 1142.
- Burns, J. W., and Buchmeier, M. J. (1991). Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**, 620-9.
- Carlson, M., and Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**, 145-54.
- Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S., and Botstein, D. (1983). The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol Cell Biol* **3**, 439-47.
- Castelmur, I., DiPaolo, C., Bachmann, M. F., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Kundig, T. M. (1993). Comparison of the sensitivity of *in vivo* and *in vitro* assays for detection of antiviral cytotoxic T cell activity. *Cell Immunol* **151**, 460-6.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B., and Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *Embo J* **14**, 2715-22.
- Chan, Y. M., and Jan, Y. N. (1999). Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* **23**, 201-4.
- Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. A., and Gould, S. J. (1999). PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* **147**, 761-74.
- Chen, L., Tai, P. C., Briggs, M. S., and Gierasch, L. M. (1987). Protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles is inhibited by functional synthetic signal peptides. *J Biol Chem* **262**, 1427-9.
- Clayton, C. E. (1987). Import of fructose biphosphate aldolase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* **105**, 2649-54.

## Literaturverzeichnis

- 
- Cline, K., Henry, R., Li, C., and Yuan, J. (1993). Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. *Embo J* **12**, 4105-14.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* **8**, 167-75.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**, 461-71.
- Crowley, K. S., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E. (1993). The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* **73**, 1101-15.
- Dalbey, R. E., and G., v. H. (1992). Signal Peptidases in prokaryotes and eukaryotes - a new protease family. *Trends in Biochem. Sci.* **17**, 474-478.
- Dalbey, R. E., and Robinson, C. (1999). Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci* **24**, 17-22.
- Dalbey, R. E., and Wickner, W. (1985). Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **260**, 15925-31.
- Dammai, V., and Subramani, S. (2001). The Human Peroxisomal Targeting Signal Receptor, Pex5p, Is Translocated into the Peroxisomal Matrix and Recycled to the Cytosol. *Cell* **105**, 187-96.
- Date, T. (1983). Demonstration by a novel genetic technique that leader peptidase is an essential enzyme of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**, 76-83.
- Dev, I. K., and Ray, P. H. (1984). Rapid assay and purification of a unique signal peptidase that processes the prolipoprotein from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* **259**, 11114-20.
- Diamond, D. L., Strobel, S., Chun, S. Y., and Randall, L. L. (1995). Interaction of SecB with intermediates along the folding pathway of maltose-binding protein. *Protein Sci* **4**, 1118-23.
- Dierstein, R., and Wickner, W. (1985). The leader region of pre-maltose binding protein binds amphiphiles. A model for self-assembly in protein export. *J Biol Chem* **260**, 15919-24.
- Dobberstein, B., Blobel, G., and Chua, N. H. (1977). *In vitro* synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 1082-5.
- Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D., and Gould, S. J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* **9**, 115-25.
- Dodt, G., and Gould, S. J. (1996). Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* **135**, 1763-74.
- Douville, K., Price, A., Eichler, J., Economou, A., and Wickner, W. (1995). SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *J Biol Chem* **270**, 20106-11.
- Dunny, G. M., and Leonard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-64.
- Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B., and Wickner, W. (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**, 1171-81.
- Economou, A., and Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**, 835-843.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* **179**, 125-42.
- Emr, S. D., Hanley-Way, S., and Silhavy, T. J. (1981). Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* **23**, 79-88.
- Engelmann, D. M., and Steitz, T. A. (1981). The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**, 411-422.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Evans, E. A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 581-5.
- Feldherr, C. M., Kallenbach, E., and Schultz, N. (1984). Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **99**, 2216-22.
- Fikes, J. D., Bankaitis, V. A., Ryan, J. P., and Bassford, P. J., Jr. (1987). Mutational alterations affecting the export competence of a truncated but fully functional maltose-binding protein signal peptide. *J Bacteriol* **169**, 2345-51.
- Firth, N., Fink, P. D., Johnson, L., and Skurray, R. A. (1994). A lipoprotein signal peptide encoded by the staphylococcal conjugative plasmid pSK41 exhibits an activity resembling that of *Enterococcus faecalis* pheromone cAD1. *J Bacteriol* **176**, 5871-3.
- Franklin, A. E., and Hoffman, N. E. (1993). Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem* **268**, 22175-80.
- Gallimore, A., Schwarz, K., van den Broek, M., Hengartner, H., and Groettrup, M. (1998). The proteasome inhibitor lactacystin prevents the generation of an endoplasmic reticulum leader-derived T cell epitope. *Mol Immunol* **35**, 581-91.
- Garcia, P. D., Ou, J. H., Rutter, W. J., and Walter, P. (1988). Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* **106**, 1093-104.
- Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-99.
- Gierasch, L. M. (1989). Signal sequences. *Biochem.* **28**, 923-930.
- Gillham, N. W., Boynton, J. E., and Hauser, C. R. (1994). Translational regulation of gene expression in chloroplasts and mitochondria. *Annu Rev Genet* **28**, 71-93.
- Gilmore, R. (1993). Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* **75**, 589-92.
- Glover, J. R., Andrews, D. W., and Rachubinski, R. A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10541-5.
- Graber, P., Fromme, P., Schmidt, G., and Boekema, E. (1988). Structure of the ATP-synthase from chloroplasts as revealed from biochemical studies and electron microscopy. *Prog Clin Biol Res* **273**, 67-74.
- Haas, J., Park, E. C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* **6**, 315-24.
- Habener, J. F., Rosenblatt, M., Dee, P. C., and Potts, J. T., Jr. (1979). Cellular processing of pre-proparathyroid hormone involves rapid hydrolysis of the leader sequence. *J Biol Chem* **254**, 10596-9.
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K., and Omura, T. (1993). A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP- dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J* **12**, 1579-86.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G., and Lithgow, T. (1995). Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* **376**, 705-9.
- Hahne, K., Haucke, V., Ramage, L., and Schatz, G. (1994). Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments. *Cell* **79**, 829-39.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**, 747-58.
- Hardy, S. J., and Randall, L. L. (1991). A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* **251**, 439-43.
- Harnish, D. G., Leung, W. C., and Rawls, W. E. (1981). Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus- infected BHK-21 cells. *J Virol* **38**, 840-8.
- Hartl, F. U., and Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**, 930-8.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T. A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**, 654-657.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G., and Lithgow, T. (1996). The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *Embo J* **15**, 1231-7.
- Haucke, V., Lithgow, T., Rospert, S., Hahne, K., and Schatz, G. (1995). The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. *J Biol Chem* **270**, 5565-70.
- Hegde, R. S., and Lingappa, V. R. (1997). Membrane protein biogenesis: Regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* **91**, 575-582.
- Heinemann, P., and Just, W. W. (1992). Peroxisomal protein import. *In vivo* evidence for a novel translocation competent compartment. *FEBS Lett* **300**, 179-82.
- Henderson, R. A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**, 1264-6.
- Hombach, J., Pircher, H., Tonegawa, S., and Zinkernagel, R. M. (1995). Strictly transporter of antigen presentation (TAP)-dependent presentation of an immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitope in the signal sequence of a virus protein. *J Exp Med* **182**, 1615-9.
- Huang, J., Hack, E., Thornburg, R. W., and Myers, A. M. (1990). A yeast mitochondrial leader peptide functions *in vivo* as a dual targeting signal for both chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* **2**, 1249-60.
- Hudrisier, D., Oldstone, M. B., and Gairin, J. E. (1997). The signal sequence of lymphocytic choriomeningitis virus contains an immunodominant cytotoxic T cell epitope that is restricted by both H- 2D(b) and H-2K(b) molecules. *Virology* **234**, 62-73.
- Hurt, E. C., Allison, D. S., Muller, U., and Schatz, G. (1987). Amino-terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus. *J Biol Chem* **262**, 1420-4.
- Hurt, E. C., Goldschmidt-Clermont, M., Pesold-Hurt, B., Rochaix, J. D., and Schatz, G. (1986). A mitochondrial presequence can transport a chloroplast-encoded protein into yeast mitochondria. *J Biol Chem* **261**, 11440-3.
- Hussain, M., Ozawa, Y., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1982). Signal peptide digestion in *Escherichia coli*. Effect of protease inhibitors on hydrolysis of the cleaved signal peptide of the major outer-membrane lipoprotein. *Eur J Biochem* **129**, 233-9.
- Inouye, M., and Halegoua, S. (1980). Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. *Crit. Rev. Biochem.* **7**, 339-371.
- Ito, K. (1982). Purification of the precursor form of maltose-binding protein, a periplasmic protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **257**, 9895-7.
- Jackson, R. C., and Blobel, G. (1977). Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5598-602.
- Jackson, R. C., and White, W. R. (1981). Phospholipid is required for the processing of presecretory proteins by detergent-solubilized canine pancreatic signal peptidase. *J Biol Chem* **256**, 2545-50.
- Johnson, A. E. (1993). Protein translocation across the ER membrane: a fluorescent light at the end of the tunnel. *Trends Biochem Sci* **18**, 456-8.
- Johnson, M. A., Snyder, W. B., Lin Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S., and Cregg, J. M. (2001). *Pichia pastoris* Pex14p, a phosphorylated peroxisomal membrane protein, is part of a PTS-receptor docking complex and interacts with many peroxins. *Yeast* **18**, 621-41.
- Jungnickel, B., and Rapoport, T. A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **82**, 261-70.
- Jungnickel, B., Rapoport, T. A., and Hartmann, E. (1994). Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett* **346**, 73-7.
-



## Literaturverzeichnis

- 
- Kaiser, C. A., Preuss, D., Grisafi, P., and Botstein, D. (1987). Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science* **235**, 312-7.
- Kalies, K. U., Rapoport, T. A., and Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* **141**, 887-94.
- Keegstra, K. (1989). Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* **56**, 247-53.
- Keegstra, K., and Cline, K. (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557-70.
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Walter, P., and Stroud, R. M. (1998). Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* **94**, 181-91.
- Kiebler, M., Becker, K., Pfanner, N., and Neupert, W. (1993). Mitochondrial protein import: specific recognition and membrane translocation of preproteins. *J Membr Biol* **135**, 191-207.
- Kim, Y. J., Rajapandi, T., and Oliver, D. (1994). SecA protein is exposed to the periplasmic surface of the E.coli inner membrane in its active state. *Cell* **78**, 845-853.
- Klappa, P., Dierks, T., and Zimmermann, R. (1996). Cyclosporin A inhibits the degradation of signal sequences after processing of presecretory proteins by signal peptidase. *Eur. J. Biochem.* **239**, 509-518.
- Klavinskis, L. S., Whitton, J. L., Joly, E., and Oldstone, M. B. (1990). Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology* **178**, 393-400.
- Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Geuze, H. J., Slot, J. W., Townsend, A., and Trowsdale, J. (1992). Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi. *Nature* **357**, 342-4.
- Koren, R., Burstein, Y., and Soreq, H. (1983). Synthetic leader peptide modulates secretion of proteins from microinjected *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 7205-9.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kraus, J. P., Novotny, J., Kalousek, F., Swaroop, M., and Rosenberg, L. E. (1988). Different structures in the amino-terminal domain of the ornithine transcarbamylase leader peptide are involved in mitochondrial import and carboxyl-terminal cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8905-9.
- Kreis, T. E., and Lodish, H. F. (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell* **46**, 929-37.
- Kuhn, A. (1987). Bacteriophage M13 procoat protein inserts into the plasma membrane as a loop structure. *Science* **238**, 1413-5.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lauffer, L., Garcia, P. D., Harkins, R. N., Coussens, L., Ullrich, A., and Walter, P. (1985). Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature* **318**, 334-8.
- Lazarow, P. B., and Fujiki, K. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**, 489-530.
- Lazzarino, D. A., and Gabel, C. A. (1988). Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport- impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation. *J Biol Chem* **263**, 10118-26.
- Lemire, B. D., Fankhauser, C., Baker, A., and Schatz, G. (1989). The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem* **264**, 20206-15.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., and Hoffman, N. E. (1995). A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3789-93.
- Li, Y., Bergeron, J. J., Luo, L., Ou, W. J., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (1996). Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9606-11.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (1994). Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**, 266-78.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (2000). The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**, 417-28.
- Lipp, J., and Dobberstein, B. (1986). The membrane-spanning segment of invariant chain (I gamma) contains a potentially cleavable signal sequence. *Cell* **46**, 1103-12.
- Lipp, J., Dobberstein, B., and Haeuptle, M. T. (1987). Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner. *J Biol Chem* **262**, 1680-4.
- Lively, M. O., and Walsh, K. A. (1983). Hen oviduct signal peptidase is an integral membrane protein. *J. Biol. Chem.* **258**, 9488-9495.
- Lodish, H. F. (1988). Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion. *J Biol Chem* **263**, 2107-10.
- Lodish, H. F., Kong, N., Hirani, S., and Rasmussen, J. (1987). A vesicular intermediate in the transport of hepatoma secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **104**, 221-30.
- Long, E. O. (1998). Signal sequences stop killer cells. *Nature* **391**, 740-1, 743.
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. (1990). Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605.
- Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C. M., van der Weijden, C. C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., and Kusters, R. (1994). An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *Embo J* **13**, 2289-96.
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T. A., and Dobberstein, B. (1995). Signal sequence processing in rough microsomes. *J Biol Chem* **270**, 19873-8.
- Majzoub, J. A., Rosenblatt, M., Fennick, B., Maunus, R., Kronenberg, H. M., Potts, J. T., Jr., and Habener, J. F. (1980). Synthetic pre-proparathyroid hormone leader sequence inhibits cell-free processing of placental, parathyroid, and pituitary prehormones. *J Biol Chem* **255**, 11478-83.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Margulis, L. (1970). Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol* **26**, 337-42.
- Martin, J., Mahlke, K., and Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* **266**, 18051-7.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1996). Snapshots of membrane-translocating proteins. *Trends Cell Biol.* **6**, 142-147.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**, 410-5.
- Martoglio, B., Graf, R., and Dobberstein, B. (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J* **16**, 6636-45.
- Martoglio, B., Hofmann, M. W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* **81**, 207-14.
- Masel, J., and Jansen, V. A. (1999). The kinetics of proteinase K digestion of linear prion polymers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **266**, 1927-31.
- Matloubian, M., Somasundaram, T., Kolhekar, S. R., Selvakumar, R., and Ahmed, R. (1990). Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J Exp Med* **172**, 1043-8.
- Matsuura, Y., Possee, R. D., and Bishop, D. H. (1986). Expression of the S-coded genes of lymphocytic choriomeningitis arenavirus using a baculovirus vector. *J Gen Virol* **67**, 1515-29.
- May, T., and Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* **12**, 53-64.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Mayer, A., Nargang, F. E., Neupert, W., and Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *Embo J* **14**, 4204-11.
- McAda, P. C., and Douglas, M. G. (1982). A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an F1-ATPase subunit precursor in mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 3177-82.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C., and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62.
- McNew, J. A., and Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J Cell Biol* **127**, 1245-57.
- Meek, R. L., Walsh, K. A., and Palmiter, R. D. (1982). The signal sequence of ovalbumin is located near the amino-terminus. *J. Biol. Chem.* **257**, 12245-12251.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700.
- Meyer, H. A., and Hartmann, E. (1997). The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem* **272**, 13159-64.
- Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A., and Prusiner, S. B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2310-4.
- Miller, J. D., Bernstein, H. D., and Walter, P. (1994). Interaction of *E. coli* Ffh/4.5S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor. *Nature* **367**, 657-9.
- Mollay, C., Vilas, U. and Kreil, G. (1982). Cleavage of honeybee prepromelittin by an endoprotease from rat liver microsomes: identification of intact signal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2260-2263.
- Momburg, F., and Hammerling, G. J. (1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* **68**, 191-256.
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X., and Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol* **146**, 45-56.
- Morrison, L. A., Lukacher, A. E., Braciale, V. L., Fan, D. P., and Braciale, T. J. (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II- restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* **163**, 903-21.
- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**, 523-33.
- Muller, G., and Zimmermann, R. (1988). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *Embo J* **7**, 639-48.
- Müller, G., and Zimmermann, R. (1987). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J.* **6**, 2099-2107.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**, 197-206.
- Ng, T. W., Brown, J. D., and Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**, 269-278.
- Nguyen, M., Bell, A. W., and Shore, G. C. (1988). Protein sorting between mitochondrial membranes specified by position of the stop-transfer domain. *J Cell Biol* **106**, 1499-505.
- Nishiyama, K., Hanada, M., and Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *Embo J* **13**, 3272-7.
- Novak, P., Ray, P.H. and Dev, I.K. (1986). Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. *J. Biol. Chem.* **261**, 420-427.
- O'Neil, K. T., and DeGrado, W. F. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci* **15**, 59-64.
- Ogg, S. C., Poritz, M. A., and Walter, P. (1992). Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 895-911.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3327-31.
- Okumoto, K., Abe, I., and Fujiki, Y. (2000). Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J Biol Chem* **275**, 25700-10.
- Oldstone, M. B., and Buchmeier, M. J. (1982). Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice. *Nature* **300**, 360-2.
- Ou, J. H., Yeh, C. T., and Yen, T. S. (1989). Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide. *J Virol* **63**, 5238-43.
- Pacaud, M. (1982). Purification and characterization of two novel proteolytic enzymes in membranes of *Escherichia coli*. Protease IV and protease V. *J Biol Chem* **257**, 4333-9.
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., and Strynadka, N. C. (1998). Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**, 186-90.
- Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**, 323-58.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**, 561-70.
- Park, S., Liu, G., Topping, T.B., Cover, W. H., and Randall, L. L. (1988). Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* **239**, 1033-1035.
- Perlman, D., and Halvorson, H. O. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol* **167**, 391-409.
- Perlman, D., Halvorson, H. O., and Cannon, L. E. (1982). Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 781-5.
- Pircher, H., Moskophidis, D., Rohrer, U., Burki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1990). Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants *in vivo*. *Nature* **346**, 629-33.
- Planz, O., Seiler, P., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1996). Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]. *Nature* **382**, 726-9.
- Pluckthun, A., and Pfitzinger, I. (1988). Membrane-bound beta-lactamase forms in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 14315-22.
- Pratje, E., and Guiard, B. (1986). One nuclear gene controls the removal of transient pre-sequences from two yeast proteins: one encoded by the nuclear the other by the mitochondrial genome. *Embo J* **5**, 1313-7.
- Princiotta, M. F., Lenz, L. L., Bevan, M. J., and Staerz, U. D. (1998). H2-M3 restricted presentation of a *Listeria*-derived leader peptide. *J Exp Med* **187**, 1711-9.
- Pugsley, A. P. (1989). Protein targeting. (San Diego, Cal.: Academic Press, Inc.).
- Rachubinski, R. A., Fujiki, Y., Mortensen, R. M., and Lazarow, P. B. (1984). Acyl-CoA oxidase and hydratase-dehydrogenase, two enzymes of the peroxisomal beta-oxidation system, are synthesized on free polysomes of clofibrate-treated rat liver. *J Cell Biol* **99**, 2241-6.
- Rachubinski, R. A., and Subramani, S. (1995). How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* **83**, 525-8.
- Rammensee, H. G., Falk, K., and Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* **11**, 213-44.
- Randall, L. L. (1983). Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cytoplasmic membrane is independent of elongation. *Cell* **33**, 231-40.
- Rapoport, T., Jungnickel, B., and Kutay, U. (1996). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 271-303.
- Rasmussen, B. A., and Bassford, P. J., Jr. (1985). Both linked and unlinked mutations can alter the intracellular site of synthesis of exported proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **161**, 258-64.
- Ray, P., Dev, I., MacGregor, C., and Bassford, P., Jr. (1986). Signal peptidases. *Curr Top Microbiol Immunol* **125**, 75-102.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Rehm, A., Stern, P., Ploegh, H. L., and Tortorella, D. (2001). Signal peptide cleavage of a type I membrane protein, HCMV US11, is dependent on its membrane anchor. *EMBO J* **20**, 1573-82.
- Richter, S., and Lamppa, G. K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7463-8.
- Robinson, C., Klosgen, R. B., Herrmann, R. G., and Shackleton, J. B. (1993). Protein translocation across the thylakoid membrane-a tale of two mechanisms. *FEBS Lett* **325**, 67-9.
- Rochaix, J. D. (1992). Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 1-28.
- Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**, 739-79.
- Roggenkamp, R., Dargatz, H., and Hollenberg, C. P. (1985). Precursor of beta-lactamase is enzymatically inactive. Accumulation of the preprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **260**, 1508-12.
- Roise, D. (1992). Interaction of a synthetic mitochondrial presequence with isolated yeast mitochondria: mechanism of binding and kinetics of import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 608-12.
- Roise, D., and Schatz, G. (1988). Mitochondrial presequences. *J Biol Chem* **263**, 4509-11.
- Rothblatt, J. A., Webb, J., Ammerer, G., and Meyer, D. I. (1987). Secretion in yeast: structural features influencing the posttranslational translocation of prepro-alpha-factor *in vitro*. *EMBO J.* **6**, 3455-3463.
- Rudner, D. Z., Fawcett, P., and Losick, R. (1999). A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14765-70.
- Russel, M., and Model, P. (1981). A mutation downstream from the signal peptidase cleavage site affects cleavage but not membrane insertion of phage coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1717-21.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., and Mihara, K. (1992). Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 16-19.
- Salvato, M., Borrow, P., Shimomaye, E., and Oldstone, M. B. (1991). Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J Virol* **65**, 1863-9.
- Salvato, M. S., and Shimomaye, E. M. (1989). The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* **173**, 1-10.
- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D., and Schekman, R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* **69**, 353-65.
- Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H., and Lazarow, P. B. (1988). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem* **263**, 10502-9.
- Sanz, P., and Meyer, D. I. (1988). Signal recognition particle (SRP) stabilizes the translocation-competent conformation of pre-secretory proteins. *EMBO J.* **7**, 3553-3557.
- Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., and Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17**, 3640-3650.
- Savitz, A. J., and Meyer, D. I. (1993). 180-kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation. *J Cell Biol* **120**, 853-63.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schatz, G. (1986). Protein translocation: a common mechanism for different membrane systems? *Nature* **321**, 108-9.
- Schekman, R. (1994). Translocation gets a push. *Cell* **78**, 911-3.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Schlenstedt, G., and Zimmermann, R. (1987). Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking proteins or ribosomes. *EMBO J.* **6**, 699-703.
- Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142.
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**, 1467-70.
- Shaw, A. E., Rottier, P. J. M., and Rose, J. K. (1988). Evidence for the loop model of signal sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7592-7596.
- Shawar, S. M., Cook, R. G., Rodgers, J. R., and Rich, R. R. (1990). Specialized functions of MHC class I molecules. I. An N-formyl peptide receptor is required for construction of the class I antigen Mta. *J Exp Med* **171**, 897-912.
- Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R., Cook, R. G., and Rich, R. R. (1991). Specialized functions of major histocompatibility complex class I molecules. II. Hmt binds N-formylated peptides of mitochondrial and prokaryotic origin. *J Exp Med* **174**, 941-4.
- Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R., and Rich, R. R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 839-80.
- Shawar, S. M., Vyas, J. M., Shen, E., Rodgers, J. R., and Rich, R. R. (1993). Differential amino-terminal anchors for peptide binding to H-2M3a or H-2Kb and H-2Db. *J Immunol* **151**, 201-10.
- Silve, S., Monod, M., Hinnen, A., and Haguenaer-Tsapis, R. (1987). The yeast acid phosphatase can enter the secretory pathway without its N-terminal signal sequence. *Mol Cell Biol* **7**, 3306-14.
- Simon, S. M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-80.
- Simon, S. M., and Blobel, G. (1992). Signal peptides open protein-conducting channels in *E. coli*. *Cell* **69**, 677-84.
- Singer, S. J., Maher, P. A., and Yaffe, M. P. (1987a). On the translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1015-9.
- Singer, S. J., Maher, P. M., and Yaffe, M. P. (1987b). On the transfer of integral proteins into membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1960-1964.
- Sipos, L., and von Heijne, G. (1993). Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur J Biochem* **213**, 1333-40.
- Spiess, M. (1995). Head or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Letters* **369**, 76-79.
- Stocks, C. E., and Lobigs, M. (1998). Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. *J Virol* **72**, 2141-9.
- Subramani, S., Koller, A., and Snyder, W. B. (2000). Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **69**, 399-418.
- Suissa, M., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes. *J Biol Chem* **257**, 13048-55.
- Swameye, I., and Schaller, H. (1997). Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation. *J. Virol.* **71**, 9434-9441.
- Szczesna-Skorupa, E., Browne, N., Mead, D., and Kemper, B. (1988). Positive charges at the NH2 terminus convert the membrane-anchor signal peptide of cytochrome P-450 to a secretory signal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 738-742.
- Tabe, L., Krieg, P., Strachan, R., Jackson, D., Wallis, E., and Colman, A. (1984). Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J Mol Biol* **180**, 645-66.
- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L., and Walter, P. (1986). The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* **103**, 1167-78.
-

## Literaturverzeichnis

- 
- Theg, S. M., and Geske, F. J. (1992). Biophysical characterization of a transit peptide directing chloroplast protein import. *Biochemistry* **31**, 5053-60.
- Unwin, P. N. (1977). Three-dimensional model of membrane-bound ribosomes obtained by electron microscopy. *Nature* **269**, 118-22.
- Vassarotti, A., Chen, W. J., Smagula, C., and Douglas, M. G. (1987a). Sequences distal to the mitochondrial targeting sequences are necessary for the maturation of the F1-ATPase beta-subunit precursor in mitochondria. *J Biol Chem* **262**, 411-8.
- Vassarotti, A., Stroud, R., and Douglas, M. (1987b). Independent mutations at the amino terminus of a protein act as surrogate signals for mitochondrial import. *Embo J* **6**, 705-11.
- Verner, K., and Schatz, G. (1988). Protein translocation across membranes. *Science* **241**, 1307-13.
- Vezza, A. C., Gard, G. P., Compans, R. W., and Bishop, D. H. (1977). Structural components of the arenavirus Pichinde. *J Virol* **23**, 776-86.
- Vimr, E. R., Green, L., and Miller, C. G. (1983). Oligopeptidase-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **153**, 1259-65.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T. A. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 25-35.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.
- von Heijne, G. (1986a). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the *trans*-membrane topology. *EMBO J.* **5**, 3021-3027.
- von Heijne, G. (1986b). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J* **5**, 1335-42.
- von Heijne, G. (1986c). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* **14**, 4683-90.
- von Heijne, G. (1986d). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* **189**, 239-42.
- von Heijne, G. (1988). Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 307-333.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membrane Biol.* **115**, 195-201.
- von Heijne, G. (1998). Life and death of a signal peptide. *Nature* **396**, 111, 113.
- Waagemann, K., and Soll, J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **271**, 6545-54.
- Wahlberg, J. M., and Spiess, M. (1997). Multiple determinants direct the orientation of signal anchor proteins: The topological role of the hydrophobic signal domain. *J. Cell Biol.* **137**, 555-562.
- Walter, P., and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7112-6.
- Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**, 557-61.
- Walter, P., and Blobel, G. (1982). 7SL small cytoplasmic RNA is an integral component of the signal recognition particle. *Nature* **299**, 691-698.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983a). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* **96**, 84-93.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983b). Signal recognition particle: a ribonucleoprotein required for cotranslational translocation of proteins, isolation and properties. *Methods Enzymol* **96**, 682-91.
- Walter, P., and Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119.
- Walton, P. A., Hill, P. E., and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* **6**, 675-83.
- Watson, M. E. (1984). Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Res* **12**, 5145-64.
-

## Literaturverzeichnis

- Watts, S., Wickner, W., and Zimmermann, R. (1983). M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2809-2813.
- Wei, M. L., and Cresswell, P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**, 443-6.
- Weihofen, A., Lemberg, M. K., Ploegh, H. L., Bogoy, M., and Martoglio, B. (2000). Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 30951-6.
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A., and Turner, R. J. (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**, 93-101.
- Weinstein, J. N., Blumenthal, R., van Renswoude, J., Kempf, C., and Klausner, R. D. (1982). Charge clusters and the orientation of membrane proteins. *J. Mem. Biol.* **66**, 203-212.
- Whitton, J. L., and Oldstone, M. B. (1989). Class I MHC can present an endogenous peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **170**, 1033-8.
- Whitton, J. L., Southern, P. J., and Oldstone, M. B. (1988). Analyses of the cytotoxic T lymphocyte responses to glycoprotein and nucleoprotein components of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **162**, 321-7.
- Wickner, W. (1988). Mechanisms of membrane assembly: General lessons from the study of M13 coat protein and *Escherichia coli* leader peptidase. *Biochemistry* **27**, 1081-1086.
- Wickner, W., Driessen, A. J., and Hartl, F. U. (1991). The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem* **60**, 101-24.
- Wickner, W., Moore, K., Dibb, N., Geissert, D., and Rice, M. (1987). Inhibition of purified *Escherichia coli* leader peptidase by the leader (signal) peptide of bacteriophage M13 procoat. *J Bacteriol* **169**, 3821-2.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-40.
- Wiemer, E. A., Nuttley, W. M., Bertolaet, B. L., Li, X., Francke, U., Wheelock, M. J., Anne, U. K., Johnson, K. R., and Subramani, S. (1995). Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders. *J Cell Biol* **130**, 51-65.
- Wiertz, E. J. H. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-779.
- Williams, D. B., Borriello, F., Zeff, R. A., and Nathenson, S. G. (1988). Intracellular transport of class I histocompatibility molecules. Influence of protein folding on transport to the cell surface. *J Biol Chem* **263**, 4549-60.
- Wright, K. E., Spiro, R. C., Burns, J. W., and Buchmeier, M. J. (1990). Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **177**, 175-83.
- Wu, H. C., and Tokunaga, M. (1986). Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **125**, 127-57.
- Yaffe, M. P., and Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4819-23.
- Ye, R. D., Wun, T. C., and Sadler, J. E. (1988). Mammalian protein secretion without signal peptide removal. Biosynthesis of plasminogen-activator inhibitor 2 in U-937 cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 4869-4875.
- Young, E. T., and Pilgrim, D. (1985). Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 3024-34.
- Zerial, M. H., D., and Garoff, H. (1987). Foreign transmembrane peptides replacing the internal signal sequence of transferrin receptor allow its translocation and membrane binding. *Cell* **48**, 147-155.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. L., and Pelham, H. R. B. (1988). Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J.* **7**, 2875-2880.
- Zwizinski, C., and Wickner, W. (1980). Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **255**, 7973-7.



## Abkürzungsverzeichnis

### 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung(en)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ATP/dATP	Adenosintriphosphat/desoxy-ATP
BiP	Bindeprotein ?
bp	Basenpaare (basepairs)
bPM	bakterielle Plasmamembran
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
CaM	Calmodulin
Ci	Curie
cDNS	komplementäre DNS
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal alkaline phosphatase)
CLAP	Chymostatin/Leupeptin/Aprotinin/Pepstatin
cpm	Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (CD8 <sup>+</sup> )
CTP/dCTP	Cytidintriphosphat/desoxy-CTP
Da	Dalton
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMEM	Zellkultur-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DP	SRP-bindendes Protein (docking protein) entspricht SR $\alpha$
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	Bakterienstamm ( <i>Escherichia coli</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
Endo H	Endoglykosidase H
eq	Equivalent (Definition für die Konzentration von RM)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Faraday (molare Elektrizitätsmenge)

## Abkürzungsverzeichnis

F <sub>ab</sub>	variable Region eines Antikörpers
F <sub>c</sub>	konstante Region eines Antikörpers
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Zell-Sortierung
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
Ffh	homologes Protein zum SRP54 (Fifty-four-homolog)
*g	x-fache Erdbeschleunigung (9,82 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
GP-1	Glykoprotein 1
GP-2	Glykoprotein 2
GP-C	Glykoprotein C
GTP/dGTP	Guanosintriphosphat/desoxy-GTP
HA	Hemagglutinin
HCMV	humanes Zytomegalovirus
HeBS	HEPES gepufferte Salzlösung (HEPES buffered saline)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV-1	menschliches Immunschwächevirus Typ I (human immunodeficiency virus Typ I)
Hsp	Hitzeschockprotein (heat shock protein)
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
k	kilo- (10 <sup>3</sup> fach)
kb	Kilobasenpaare (kilobasepairs)
kDa	Kilo-Dalton
KLH	(keyhole limpet heme)
KRM	Hochsalz (KOAc)-behandelte RM
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LBA-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis Virus
Leu	Leucin
Iip33	Invariante Kette (33 kDa-Isoform)
m	milli- (10 <sup>-3</sup> fach)
M	molar (mol/l)
2-ME	Ethanthiol (β-Mercaptoethanol, 2-Mercaptoethanol)
7-Methyl-GMP	7-Methyl-Guanosinmonophosphat
µ	mycro- (10 <sup>-6</sup> fach)
mg	Milligramm (10 <sup>-3</sup> Gramm)
MG	Molekulargewicht

## Abkürzungsverzeichnis

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ Liter)
mM	millimolar ( $10^{-3}$ mol/l)
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)
MSF	Mitochondrialer Import-stimulierender Faktor
n	nano- ( $10^{-9}$ fach)
NAC	naszierendes Polypeptid-assoziiierter Komplex
Nikkol	Octaethylenglycolmonododecylether
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ Meter)
NP-40	Nonidet P-40
NPC	nuklärer Porenkomplex (nuclear pore complex)
NTP	Nukleosidtriphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP)
OAc	Azetat-Ion ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )
p	pico- ( $10^{-12}$ fach)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethansulfonylfleurid
PKRM	Puromycin- und Hochsalz-behandelte RM
PM	Plasmamembran
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
pPL	Preprolaktin
PTS	peroxisomales Signal zum zielgerichteten Transport (peroxisome targeting signal)
PVDF	Polyvinylfluorid
rER	rauhes ER
Rip	regulierte <i>intra</i> -Membranproteolyse
RM	Rauhe Mikrosomen
RNaseA	Ribonuklease A
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	denaturierende PAGE mit SDS
Sec	Sekretion
Sec61 $\beta$	Protein des Sec61-Komplexes („Translokon“)
SP	Signalpeptid (entspricht abgespalteter SS)

## Abkürzungsverzeichnis

SPase	Signalpeptidase
SPC	SPase-Komplex
SPF	Signalpeptidfragment
SPPase	Signalpeptidpeptidase
SR	SRP-Rezeptor (besteht aus SR $\alpha$ und SR $\beta$ )
SRP	Signalerkennungspartikel (signal recognition particle)
SRP54	54 kDa-Protein des SRP
SS	Signalsequenz
Std.	Stunde(n)
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-Carboxylat
Tab.	Tabelle(n)
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TAP	Transporter, der mit der Antigen-Prozessierung assoziiert ist (transporter associated with antigen processing)
TAT	Translokation von Zwillingsargininen (twin-arginine translocation)
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TENS	Tris/EDTA/NaOH/SDS-Puffer
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Thr	Threonin
Tim/Tom	Translokase der inneren/äußeren Mitochondrien-Membran
TRAM	translozierend-naszierende Polypeptidkette-assoziiertes Membran-Protein (translocating nascent polypeptide-associated membrane protein)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
TTP/dTTP	Thymidintriphosphat/desoxy-TTP
U	Enzymeinheit (unit)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

## **Danksagung**

---

Für die vielfältige Unterstützung, die mir im Zuge dieser Doktorarbeit zukam, möchte ich folgenden Personen herzlich danken:

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor selbständig arbeiten zu können, sowie für die sehr kritische Betreuung und seine Bemühungen, mich nicht nur in der Forschung, sondern auch im Leben auf den richtigen Weg zu bringen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Eduard Hurt dafür danken, daß er als zweiter Gutachter zur Verfügung steht.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Labors Dobberstein gilt mein Dank für eine gute Arbeitsatmosphäre, die zu manchen Zeiten besonders wichtig war.

Speziell möchte ich Martin Pool erwähnen, der immer wieder mit guten Vorschlägen und konstruktiver Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Thank you very much, Martin !

Ich möchte mich auch bei den weiteren Mitarbeitern des ZMBH bedanken, die mir auf unterschiedliche Art und Weise geholfen haben.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. Marcus Groettrup und seinen Mitarbeitern für die sehr freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit in seinem Labor in St. Gallen, Schweiz.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Meike Jochemczyk für die vielfältigen Bemühungen, mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit zu unterstützen.

Es hat Spaß gemacht !